

## Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) シグナルの細胞内因子による活性調節機構の解明

著者	徳江 辰一
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/40179">http://hdl.handle.net/10097/40179</a>

# G タンパク質共役型受容体 (GPCR) シグナルの 細胞内因子による活性調節機構の解明

東北大学大学院薬学研究科生命薬学専攻

細胞情報薬学分野

徳江 辰一

## 目次

第 1 章 緒言 .....	1
第 2 章 RGS9-1 anchoring protein (R9AP)による RGS9-1 の $G_{i/o}$ 特異的 GAP 活性制御機構及び結合部位の解明	
2-1. 序論 .....	8
2-2. 実験方法 .....	14
2-3. 結果 .....	21
2-4. 考察 .....	30
第 3 章 $TXA_2$ 受容体 (TP)新規結合タンパク質 TP interacting protein (TPIP)の機能解析	
3-1. 序論 .....	35
3-2. 実験方法 .....	38
3-3. 結果 .....	45
3-4. 考察 .....	55
第 4 章 総括 .....	59
参考文献 .....	62
謝辞 .....	73

## 略語表

本文中の略語は以下に示す一覧表に従って用いた。

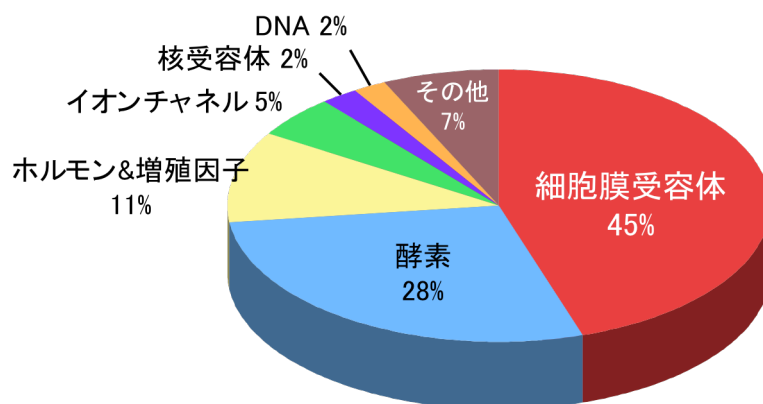
AGS	activator of G protein signaling
ATP	adenosine 5'-triphosphate
BSA	bovine serum albumin
cAMP	adenosine 3',5'-monophosphate (cyclic AMP)
cDNA	complementary DNA
cPLA <sub>2</sub>	cytosolic phospholipase A <sub>2</sub>
DAG	diacylglycerol
DEP	Disheveled/EGL10/Pleckstrin
DEPC	diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates
ECL	enhanced chemiluminescence
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
FCS	fetal calf serum
GA3PDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GAP	GTPase-activating protein
GDP	guanosine 5'-diphosphate
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GGL	G $\gamma$ -like
GIRK	G protein coupled inwardly rectifying K <sup>+</sup> channel
GRK	G protein-coupled receptor kinase
GPCR	G protein-coupled receptor
GTP	guanosine 5'-triphosphate
HRP	horseradish peroxidase
IgG	immunoglobulin G
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-trisphosphate
mRNA	messenger ribonucleic acid

NP40	nonident P-40
PCR	polymerase chain reaction
PDE	phosphodiesterase
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PKG	protein kinase G
PLC	phospholipase C
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PS	phosphatidylserine
PTHr	parathyroid hormone receptor
PTX	pertussis toxin
PVDF	polyvinylidene difluoride
R9AP	RGS9-1 anchoring protein
RGS	regulator of G protein signaling
RT	reverse transcription
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline containing Tween 20
TCA	trichloroacetic acid
TP	thromboxane A <sub>2</sub> receptor
TPIP	thromboxane A <sub>2</sub> receptor interacting protein
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
Triton X-100	polyoxyethylene (10) octylphenyl ether
TXA <sub>2</sub>	thromboxane A <sub>2</sub>
UK14304	5-bromo-6-[2-imidazolin-2-ylamine]-quinoxaline bitartrate

## 1 章 緒言

細胞は生体を構成する最小単位であり、人間の体は約 60 兆個の細胞からなっている。細胞はその構成部位、臓器によって様々な形態や機能を持つとともに、その機能である増殖、分化、細胞死の誘導などは外界からのシグナルによって厳密に制御されている。細胞膜上には細胞外シグナルに対する高い特異性と親和性を有する「受容体」が存在し、様々な細胞外シグナルを細胞内シグナルへと転換する。

G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) は細胞表面受容体の中で最大のファミリーを構成しており、人では約 800 種類の存在がゲノムプロジェクトの結果から明らかにされている[1]。GPCR に結合するリガンドは神経伝達物質、ホルモン、オータコイドなど極めて多彩な機能を有し、それらの分子構造もペプチドやアミノ酸をはじめ多様である。一方、GPCR は、1 本のポリペプチドが細胞膜を 7 回貫通する特徴的な保存された構造を有している。GPCR に共通する一般的な基本的機能は、細胞外から情報を受け取ると立体構造の変化が生じ、共役している三量体 G タンパク質の活性化を介して細胞



Science (2000) 287, 1960-1964より改変

Fig. 1-1 Target proteins for current medicines

内へとシグナルを伝達することである。現在、臨床で使用されている医薬品の約半数が GPCR を標的としており[2]、GPCR とその関連タンパク質は創薬のターゲットとして重要な位置を占めている (Fig. 1-1)。

GPCR に共役する三量体 G タンパク質は $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$ の三種類のサブユニットからなるヘテロ三量体構造をとっており、 $\alpha$ サブユニットの果たす機能およびアミノ酸配列の相同性によって  $G_s$ 、 $G_i$ 、 $G_q$ 、及び  $G_{12}$  の 4 つのファミリーに分類される (Table 1-1)。不活性状態の G タンパク質は、 $\alpha$ サブユニットに GDP が結合したヘテロ三量体構造をとっているが、GPCR によって活性化された G タンパク質は、 $\alpha$ サブユニットから GDP を解離し、代わりに GTP を結合して GTP 結合型  $G\alpha$  (活性型  $G\alpha$ ) と  $\beta\gamma$ 複合体 ( $G\beta\gamma$ ) に解離する (Fig. 1-2)。解離した $\alpha$ サブユニットは種々の酵素活性を制御する。例えば  $G\alpha_s$  は細胞膜タンパク質であるアデニル酸シクラーゼを活性化し、アデノシン 5'-三リン酸 (adenosine 5'-triphosphate; ATP) からサイクリック AMP (adenosine 3',5'-monophosphate; cAMP) の産生、それに引き続くプロテインキナーゼ A (protein kinase A; PKA) の活性化を引き起こす[3, 4]。逆に  $G\alpha_i$  はアデニル酸シクラーゼの不活性化を引

**Table 1-1. Classification of trimeric G proteins**

Class	Member	Distribution	Effector
$G\alpha_s$	$G\alpha_s$ $G\alpha_{olf}$	Ubiquitous Olfactory bulb	[ Adenylyl cyclase (stimulation) Ca <sup>2+</sup> channel
$G\alpha_i$	$G\alpha_{i1}$ , $G\alpha_{i2}$ , $G\alpha_{i3}$ $G\alpha_{o1}$ , $G\alpha_{o2}$ $G\alpha_{t1}$ , $G\alpha_{t2}$ $G\alpha_{gust}$	Ubiquitous Brain, Neuron Retina Taste bulb	[ Adenylyl cyclase (inhibition) K <sup>+</sup> channel, Ca <sup>2+</sup> channel cGMP phosphodiesterase ( $G\alpha_i$ )
$G\alpha_q$	$G\alpha_q$ , $G\alpha_{11}$ $G\alpha_{14}$ $G\alpha_{15}$ $G\alpha_{16}$	Ubiquitous Ling, Kidney, Liver T cell B cell	[ Phospholipase C $\beta$ Btk tyrosine kinase ( $G\alpha_q$ )
$G\alpha_{12}$	$G\alpha_{12}$ $G\alpha_{13}$	Ubiquitous	[ p115Rho-GEF ( $G\alpha_{13}$ ) Btk tyrosine kinase ( $G\alpha_{12}$ ) Gap1 <sup>m</sup> ( $G\alpha_{12}$ )

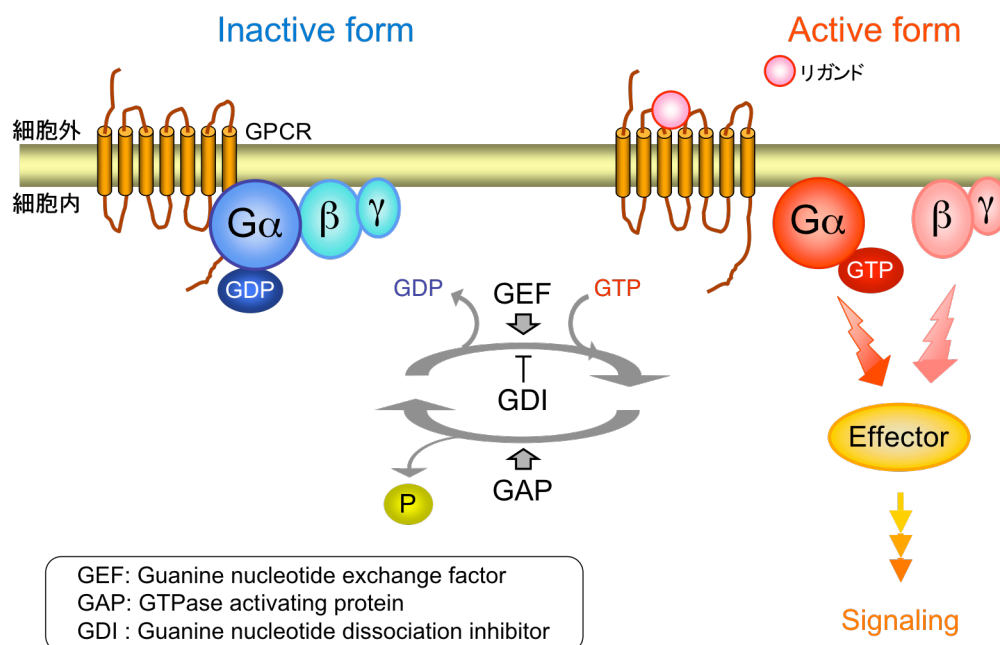


Fig. 1-2 Model of G protein signaling.

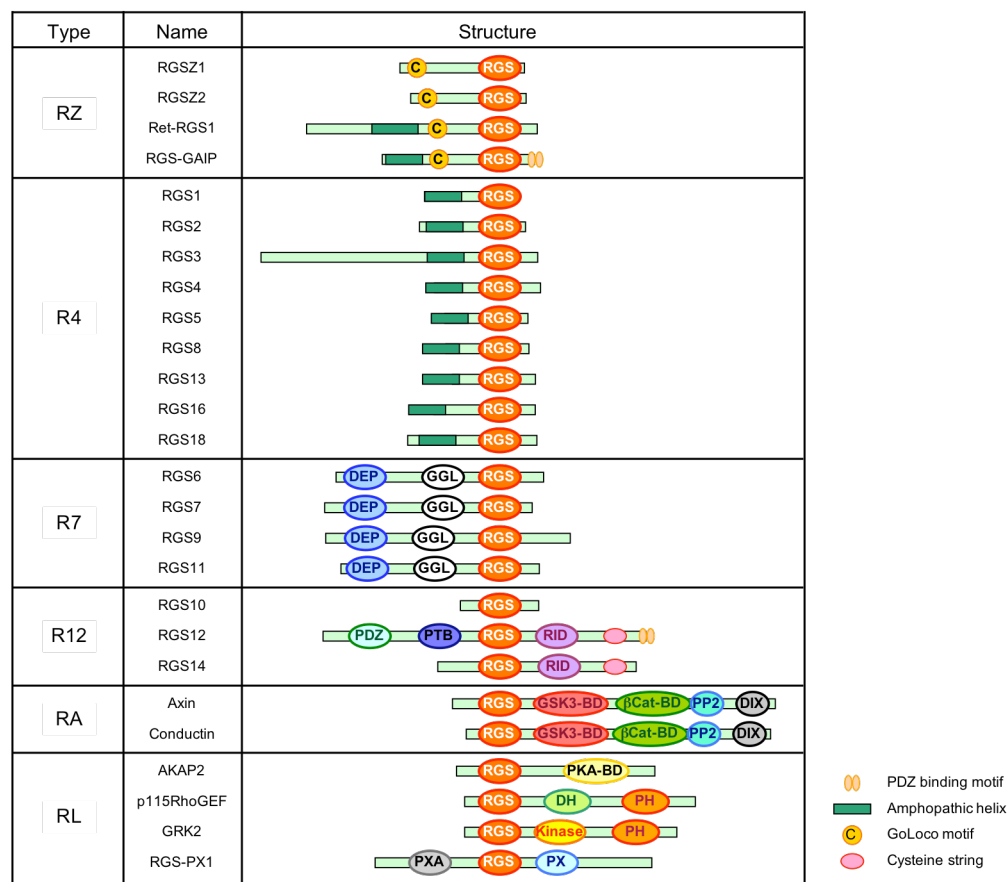
き起こす[3, 4]。  $G\alpha_q$  はホスホリパーゼ  $C\beta$  (PLC $\beta$ ) を活性化し[4, 5]、続いてホスファチジルイノシトール (4,5)-二リン酸が分解されてイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP $_3$ ) とジアシルグリセロール (diacylglycerol; DAG) が産生される。IP $_3$  は小胞体膜上に存在する IP $_3$  受容体に作用し細胞質への Ca $^{2+}$  放出を引き起こすのに対し、DAG はプロテインキナーゼ C (protein kinase C; PKC) の活性化を引き起こす。  $G\alpha_{12}$  は RhoGEF (Rho guanine nucleotide exchange factor) の活性化や Rho キナーゼの活性化を引き起こすことが知られている[6]。活性化された  $G\alpha$  サブユニット上の GTP は、やがて  $G\alpha$  自身の持つ GTP 加水分解活性 (GTPase 活性) によって分解され GDP となり、再び三量体を形成することによって不活性型に戻る。一方、  $G\beta\gamma$  は常にヘテロダイマーとして存在しており、活性型  $G\alpha$  とは対照的にその作用は長く闇に包まれていた。しかし近年、  $G\beta\gamma$  による GIRK (G protein-coupled inwardly rectifying K $^+$  channel) の活性化や [7-10]、PLC $\beta$  の活性化[5] など様々なエフェクターの活性化を起こすことが報告



されており、注目が集まっている。

この様に三量体 G タンパク質を介するシグナル伝達の基本的な機構は明らかになってきた。しかしその一方で、これらシグナル伝達はこれまで考えられていた単純な経路ではなく、様々な因子によって巧妙に制御を受けていることも報告されている。例えば GPCR の多量体化もそのうちの一つである。GABA<sub>B</sub> 受容体には二種類のサブタイプが存在し、このサブタイプ同士でヘテロ二量体以上のオリゴマーを形成することが報告されている[11]。オリゴマーを形成した GABA<sub>B</sub> 受容体は、シグナル伝達効率の上昇、受容体の細胞表面量増加が引き起こされる。

一方、三量体 G タンパク質自身の活性を直接制御する因子も存在する。その一つとして、近年 Gαの活性を負に制御する Regulator of G protein signaling (RGS) が注目を集めている。実際 Gαサブユニット自身が有する GTPase 活性はあまり強くなく、Gαサブユニットのみでは G タンパク質の不活性化の時間経過は遅い。これに対し、細胞内での G タンパク質の不活性化は速やかな時間経過で生じる[12]。RGS は GTPase-activating protein (GAP) としての作用をもち、活性化型 Gαサブユニットの GTP を速やかに加水分解し、不活性型の GDP 結合型へと戻すことで迅速なシグナルの停止を可能としている。RGS は、哺乳類において現在までに 30 種類以上のアイソフォームが知られており[13, 14]、その構造、機能の特徴などから 6 つのサブファミリーに分類されている (Fig. 1-3)。RGS ファミリーのメンバーはすべて約 120 アミノ酸からなる RGS ドメインと呼ばれる領域を共有しており、このドメインを介して GAP 活性をもたらすと考えられている[13, 14]。一方、RGS タンパク質は、その大きさがおよそ 160 から 1,400 アミノ酸残基と幅広く、ほとんどの RGS ファミリーは RGS ドメイン以外に異なるドメインを併せて保持している。実際、これらドメインに



**Fig. 1-3 Classification of mammalian RGS and RGS-like proteins**

より GAP 活性だけではなく多彩な機能を発揮することが報告されている[13, 14]。例えば、p115RhoGEF は  $G\alpha_{13}$  の GAP として作用することが知られている他、small G タンパク質の一つである Rho の GEF としても働く領域を有する[15-17]。RGS14 は  $G\alpha_0$  の GAP である一方、Ras ファミリーの Rap1、Rap2 に結合し、これらの GEF として作用する領域を保持している[18, 19]。また、RGS12 は PDZ ドメインをもち、そのドメインを介した膜タンパク質への結合が報告されている[20, 21]。この様に RGS ファミリーが保持するドメインには GAP 活性機能発現に対して補助的に作用するものや、GAP 活性とは独立した作用を持つものが存在する。一方、RGS 自身の活性制御機構が明らかにされていないものも少なくない。例えば、 $G_{i/o}$  ファミリーの  $G\alpha$  特異的に GAP 活性を示

す R7-RGS サブファミリーなどがある。 *In vitro* の細胞膜再構築系の実験においては、R7-RGS はそれのみでは生体内で見られる GAP 活性と比較して非常に弱い活性しか示さない[22]。R7-RGS ファミリーは共通の構造として、GAP 活性を示す RGS ドメインの他、GGL (G-protein  $\gamma$  subunit-like) ドメイン、DEP (Disheveled/EGL10/Pleckstrin) ドメインを持っている[23, 24]。GGL ドメインは G タンパク質 $\beta 5$  サブユニット (G $\beta 5$ ) と結合してダイマーを形成することが知られているが[24-27]、その生理的意義については明らかになっていない。また、DEP ドメインは細胞膜局在に関与しているという報告[28]があるが、これについてもその機能の詳細は明らかにされていない。生体内における R7-RGS の GAP 活性機能発現機構を解明するには、それぞれのドメイン機能を明らかにすることが非常に重要である。

さらに三量体Gタンパク質を介するシグナル伝達はGPCRのリン酸化やGPCRに結合するタンパク質によっても制御されている。GPCRのリン酸化に関与するタンパク質として代表的なものにGタンパク質共役型受容体キナーゼ (G protein-coupled receptor kinase; GRK) が知られている[29]。GRKはアゴニストにより活性化したGPCRの細胞内領域をリン酸化し、さらにそのリン酸化部位を $\beta$ -アレスチンが認識し結合することによってGPCRのインターナリゼーションが誘発される[29]。インターナリゼーションしたGPCRは細胞外のリガンドとの会合が制限されるためシグナルの脱感作が引き起こされる。また、GPCRのリン酸化にはGRK以外にもPKAやPKC、PKGの関与が報告されている[30]。一方、GPCRの細胞内領域に結合しGPCR機能を制御するタンパク質としてARF4がある。ARF4は細胞内輸送を制御するsmall Gタンパク質であり、GPCRの一つであるロドプシンの細胞内C末端領域に結合する[31]。ARF4と結合したロドプシンは細胞膜上からpost-ゴルジ体に輸送されることが報告されているが、その生理的意義は明らかにされていない。また、足場タンパク質として知られる

14-3-3タンパク質はGPCRの1つである副甲状腺ホルモン受容体 (PTHrP) の細胞内C末端領域に結合し、PTHrPの細胞膜から核への局在変化を引き起こすことが報告されている[32]。

これまで、三量体Gタンパク質シグナルを制御する様々な因子の存在が明らかにされてきた。その一方で、これらシグナル伝達には未だ報告されていない多くの制御タンパク質が存在すると考えられている。前述した通り、GPCRは創薬のターゲットとして非常に重要な位置を占めている。したがって、未だ明らかにされていないGPCR制御タンパク質の機能を一つ一つ明らかにすることは創薬を考える上で非常に重要である。

本研究は GPCR シグナルの細胞内因子による活性調節機構の解明を目的として、第2章では RGS9-1 の  $G\alpha_{i/o}$  に対する GAP 活性促進メカニズムの解明について、第3章では GPCR の一つであるトロンボキサン  $A_2$  受容体 (TP) に結合する新規タンパク質として TP interacting protein (TPIP) を同定し、TPIP による TP シグナル制御メカニズムについて検討を行った。

## 第2章 RGS9-1 anchoring protein (R9AP) による RGS9-1 の $G_{i/o}$ 特異的 GAP 活性制御機構及び結合部位の解明

### 2-1 序論

私たちが物を見るとき、光の刺激により網膜視細胞に存在するGPCRであるロドプシンが活性化する。活性化したロドプシンはさらに三量体Gタンパク質であり  $G_{i/o}$  ファミリーに属するトランスデュシン ( $G_t$ ) を活性化させ、続いて cGMP ホスホジエステラーゼ (cGMP PDE) が活性化して、セカンドメッセンジャーであるcGMPが分解される。その結果、細胞膜に存在するcGMP依存性  $Na^+$  チャンネルが閉じることにより過分極が起こる。過分極により視細胞内節の終末から、伝達物質が放出される。これが網膜視細胞における光応答である。光の情報伝達においてシグナルをすばやく終結させることは、次のシグナルを開始するために必要不可欠であり、このシグナルの終結にRGS9-1のGAP活性が大きな役割を果たしていると考えられている。実際、明暗順応に異常がある患者においてRGS9-1遺伝子にホモのミスセンス変異W299Rが認められ、この変異によりRGS9-1のGAP活性は野生型に比べ20分の1に減少するという報告がある[33]。しかし、*in vitro*の再構成実験において、RGS9-1のみでは網膜で観察される程度の高いGAP活性は確認できない[22]。このことから、RGS9-1以外の  $G_{\alpha_t}$  に対するGAP活性促進因子の探索が行われ、その結果、ウシ網膜外節膜においてRGS9-1と複合体を形成する分子としてR9AP (RGS9-1 anchoring protein) が同定された[34]。R9APは全長235アミノ酸からなり、4つの $\alpha$ -helixを分子内に有する[35, 36]。またC末端には疎水性アミノ酸を多く含む一カ所の膜貫通ドメインを有している。先に述べた明暗順応に異常がある患者の中には、RGS9-1遺

伝子の変異以外に、R9APのフレームシフト変異（ホモ）が認められる患者も確認されている[33]。Huら[37]は*in vitro*の系においてR9APがRGS9-1のGAP活性を高めることを報告している。しかし、細胞レベルにおいてR9APがRGS9-1のGAP活性を増強するのかについては、未だ確認されていない。R9APは膜貫通ドメインをもつことから、細胞膜にRGS9-1を局在させることが予想される。しかし、R9APによるRGS9-1の細胞膜への局在化から、どのようにRGS9-1のGAP活性の促進へと繋がるのか、未だ詳細は明らかにされていない。

R9AP の RGS9-1 機能制御様式を考える上での一つの可能性として、近年効率的な細胞情報伝達への関与が示唆されている脂質ラフトが挙げられる。1972年に Singer ら[38]は、脂質二重層よりなる細胞膜の中を膜タンパク質が自由に動くという流動モザイクモデルを提唱したが、そこには膜の不均一性という概念は含まれていなかった。最近 Simons ら[39]は細胞膜が均一でないことを示し、これを説明するものとして「脂質ラフト」という概念を提唱した。彼らは脂質ラフトを、限局された膜領域が膜上を移動するための“いかだ”（raft）として定義し、現在では広くこの概念は受け入れられている。脂質ラフトは、コレステロール、スフィンゴミエリン、糖脂質に富んでいるマイクロドメインである。さらに近年、脂質ラフトの生理的役割として重要視されているものの一つに、外界からの刺激に対応した細胞のシグナル伝達効率を高めるという点である。細胞が外部から刺激を受けた時、より特異的、効率的なシグナル伝達をするためには、細胞膜が漠然とした一様な構造ではなく、それぞれの部分がある程度独立した機能単位として分離確立している必要がある。実際、多くの増殖因子の受容体やGPCR、三量体および低分子量Gタンパク質、そのエフェクター分子であるアデニル酸シクラーゼ、チロシンキナーゼであるSrcファミリーなど、多彩なシグナル伝達分子の脂質ラフトへの集積が報告されている[40]。さらに、Nebl ら[41]は  $G\alpha_{i/o}$  が脂質ラフトに局在することを報告している。R7-RGS は

G<sub>i</sub>ファミリーに対して GAP 活性を示すことが知られていることから、RGS9-1 が GAP 活性を発現するためには G $\alpha_{i0}$ が存在する脂質ラフトに局在する必要があると考えられる。さらに、このとき R9AP が RGS9-1 を脂質ラフトに集積させる上で何らかの役割を有している可能性が考えられる。

R7-RGS ファミリーは RGS9-1 以外に RGS6、RGS7、RGS9-2、RGS11 から構成され、そのドメイン配列はファミリー間で非常によく保存されている (Fig. 2-1)。このうち、GGL ドメインは G $\beta$ 5 との結合に必要なドメインであり、R7-RGS は常に G $\beta$ 5 とのダイマーとして存在することによってタンパク質の安定性を保っていると考えられる[25, 26, 42]。さらに、R7-RGS が G $\beta$ 5 とダイマーを形成している様式が G $\beta$  $\gamma$ に似ていることから、R7-RGS/G $\beta$ 5 が G $\beta$  $\gamma$ の如くエフェクターを活性化すると仮説も考えられている[43]。また、RGS ドメインは GAP 活性発現に必須のドメインであることが知られる。一方、DEP ドメ

		DEP domain	
AF107619mRGS6	1:MAQSGDQRAV-GVADPEESP--NMIVYCKLESDITKMDDKTGGVPPIRTVKSFLSKIP	57	
AF493931hRGS7s2	1:MAQNNYGGQTSNGVADESP-----NMLVYREMEDVIARMQDEKNGI-PIRTVKSFLSKIP	54	
AAC99481mRGS9-1	1:-----MTIRHQGQOYR-PR--MAFLQKLEALVKDMQNPETGVVM-HNQRLVLTVP	47	
AF493933 hRGS9L	1:-----MTIRHQGQOYR-PR--MAFLQKLEALVKDMQNPETGVVM-QNQRVLVTVP	47	
AF035153hRGS11	1:-----MAAGPAPPPGR-PRAQMPHLRKMERSVVSMDQDPDQGVKM-RSQRLLVTVIP	49	
		Intermediate domain	
AF107619mRGS6	58:SVVTGTDIVQWLKMNLSIEDPVEAIHLGSLIAAGYIFFISDHVLT-MKDDGTFYRFQAP	116	
AF493931hRGS7s2	55:SVFSGSDIVQWLKLNLTIEDPVEALHLGTLMAAHGYFFPISDHVLT-LKDDGTFYRFQAP	113	
AAC99481mRGS9-1	48:HMTGGDVLQWITQRLWISNLEAQ-NLGNLVKYGYYIPLQDPKNLILKPDSSLYRFQAP	106	
AF493933 hRGS9L	48:HMTGSDVLQWIVQRLWISSLEAQ-NLGNFIVRYGYIYPLQDPKNLILKPDGSLYRFQAP	106	
AF035153hRGS11	50:HAVTGSDDVQWLAKKFCVSEEAAL-HLGAVLVQHGYIYPLRDPRLMLRPDETYPYRFQAP	108	
AF107619mRGS6	117:YFWPSNCWEPENTDYAIYLCRTMQNKARLELADYEAENLARLQRAFARKWEFIFMQAEA	176	
AF493931hRGS7s2	114:YFWPSNCWEPENTDYAVYLCKRTMQNKARLELADYEAESLARLQRAFARKWEFIFMQAEA	173	
AAC99481mRGS9-1	107:YFWPTQQWPAEDTDYAIYLAKRNIKKKGILE--EYKKNYDFLNKKINYNKDFVIMRAKE	164	
AF493933 hRGS9L	107:YFWPTQQWPAEDTDYAIYLAKRNIKKKGILE--EYKKNYDFLNQRMNKNYNKDFVIMRAKE	164	
AF035153hRGS11	109:YFWTSTLRPAELDYAIYLAKKNIRKRGTLV--DYEKDCYDRLHKKINHAWDLVLMQARE	166	
		GGL domain	
AF107619mRGS6	177:QVKIDRKDKTERKILDSQERAFWDVHRFPVPGCVNTEMDIRKCRRLKNPKVKKSVYGV	236	
AF493931hRGS7s2	174:QAKVDKRDKIERKILDSQERAFWDVHRFPVPGCVNTEVDIKKSSRMNPKPKTRKSVYGL	233	
AAC99481mRGS9-1	165:QYRTGKERNKADRYALDCQEKAYWLVRHSPPGMNNVLDYGLDRVTNPN-----	212	
AF493933 hRGS9L	165:QYRAGKERNKADRYALDCQEKAYWLVRHCPPGMDNVLDYGLDRVTNPNFNEVK-----	215	
AF035153hRGS11	167:QLRAAKQRSKGDRLVIACQEQTYWLVNRPPPGAPDVLEQGPGRGSCAASR-----	216	
AF107619mRGS6	237:TEESQAQSPVHVLSPPIRKPTTKEDIRKQITFLNAQIDRHCLKMSKVAESLIAYTEQYVEY	296	
AF493931hRGS7s2	234:QNDIRSHSPHTPTPTETKPTTEDELQQQIKYQWQIQDLRHLKMSKVADSLLSYTEQYLEY	293	
AAC99481mRGS9-1	213:-----EVKKQITVAVRKEIMYYQQALMRSTVKSSVSLGGIVKYSEQFSSN	257	
AF493933 hRGS9L	216:-----VNQKQITVVAVKKEIMYYQQALMRSTVKSSVSLGGIVKYSEQFSSN	260	
AF035153hRGS11	217:-----VLMTKSADFHKREIEYFRKALGRTRVKSSVCLEAYLSFCGQGRPH	261	





インは細胞膜への結合に関与すると考えられているが、その機能は明確にされていないのが現状である。さらに、DEP ドメインと GGL ドメインの間の介在配列の部分も Fig. 2-1 に示すとおり各種 R7-RGS のアミノ酸配列の相同性は高いが、機能はよく知られていない。

これまで、RGS9-1 と R9AP との結合には DEP ドメインの関与が報告されてきた。Guang ら[37]は GGL ドメインより N 末端側を削除することで、R9AP による GAP 活性促進作用が見られなくなることを報告している。彼らは DEP ドメインが結合に関与していると考察しているが、この場合 DEP ドメインおよび GGL ドメインの間に存在する介在配列の関与も否定できず、詳細な結合部位については検討されていない。

R7-RGS の組織内分布としては、RGS9-1 は網膜に特異的に発現し、R9AP と結合することが知られている。一方、RGS9-2 は RGS9-1 のスプライシングバリエントであり、C 末端領域が RGS9-1 よりも 191 アミノ酸長い配列を持っており、線条体に多く発現している[44-46]。RGS6、RGS7、RGS11 も中枢神経系に広く分布していることが知られている[24, 25]。

R9AP は元々ウシ網膜から同定され、網膜特異的に局在していることが報告されてきたが[34]、最近、トリにおいて網膜以外にも広く中枢神経系に発現していること[36]、さらに、マウスにおいても中枢神経系で R9AP の発現が見られるという報告がなされた[36]。このことから、中枢神経系において R9AP と RGS9-1 以外の R7-RGS とが会合している可能性も考えられ、RGS9-1 と同様に GAP 活性が制御されている可能性がある。

そこで本章では、細胞レベルにおける R9AP の RGS9-1GAP 活性増強作用を明らかにするため、まず受容体刺激による  $G\alpha_{i/o}$  活性化シグナルに対する RGS9-1、R9AP の影響について検討を試みた。さらに、R9AP の GAP 活性増強作用に対する脂質ラフトの関与を明らかにするため、RGS9-1 および R9AP

の脂質ラフトへの局在性について検討を試みた。また、各種 RGS9-1 欠損変異株を作製し、R9AP との結合性を詳細に調べることにより、RGS9-1 の結合部位をさらに詳しく検討した。さらに、RGS9-1 以外の R7-RGS と R9AP の相互作用について検討することにより、他の R7-RGS に対する R9AP を介した活性制御の可能性について考察するとともに、RGS9-1 と R9AP の結合部位についてのさらなる情報を得ることを試みた。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 細胞の培養

NG108-15 細胞は 0.45% グルコース含有 DMEM に 5% FCS 及びストレプトマイシン (50 µg/ml) ペニシリン (50 U/ml) を添加し、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で培養した。COS7 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地に 10% fetal calf serum (FCS) 及びストレプトマイシン (50 µg/ml) を添加し、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で培養した。

### 2-2-2 プラスミド作製

目的タンパク質の C 末端に GFP 標識する哺乳動物細胞発現ベクターとして、pEGFP-N1 (Clontech) を用いた。RGS9-1 FULL/pEGFP-N1、RGS9-1 D/pEGFP-N1、RGS9-1 DI/pEGFP-N1、RGS9-1 I/pEGFP-N1、RGS9-1 GR/pEGFP-N1 は RGS9-1/pHM6 をテンプレートとして PCR 反応により作製した。プライマーにはそれぞれ制限酵素部位として *EcoR* I 配列及び *Apa* I 配列を含むものを設計した。設計したプライマーは以下の通りである。

RGS9-1 FULL/pEGFP-N1

5'-GCGGAGAATTCTGAATGACGATCCGCACCAAGGC-3'

5'-CATAAGGGCCCTCTTGCTCATGACCTGGGTGATG-3'

RGS9-1 D/pEGFP-N1

5'-GCGGAGAATTCTGAATGACGATCCGACACCAAGGC-3'

5'-GAATTAGGGCCCGCGTCTGAATCGGTAGAGACTG-3'

RGS9-1 DI/pEGFP-N1

5'-GCGGAGAATTCTGAATGACGATCCGACACCAAGGC-3'

5'-GTCGAGGGCCCGGACAGTTTGTCTTAACTTCG-3'

RGS9-1 I/pEGFP-N1

5'-CCGTCGAATTCCTCCATATTTCTGGCCACGCAG-3'

5'-GTCGAGGGCCCGGACAGTTTGTCTTAACTTCG-3'、

RGS9-1GR/pEGFP-N1

5'-CCGTCGAATTCGCACTGCTGTCAGAAAAGAGATC-3'

5'-CATAAGGGCCCTCTTGCTCATGACCTGGGTGATG-3'

PCR 反応は PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ RESERCH) を用い、PCR 酵素には PfuTurbo® DNA polymerase (Stratagene) を用いた。得られた PCR 産物を精製し、*EcoR* I 及び *Apa* I で切断し、あらかじめ *EcoR* I 及び *Apa* I で切断した pEGFP-N1 に挿入した。ライゲーション反応は Quick T4 DNA Ligase (BioLabs) を用いて室温で 10 時間インキュベートすることで行った。

### 2-2-3 UK14304 刺激による ERK1/2 リン酸化の検討

NG108-15 細胞を  $5 \times 10^4$  cells/well で 12 well plate に播種し、24 時間培養後、各種プラスミド DNA をトランスフェクションした。用いたプラスミド DNA は HA-RGS9-1/pHM6、FLAG-G $\beta$ 5L/pcDNA3.1 (+)、または myc-R9AP/pcDNA3.1 (+) であり、それぞれ組み合わせて用いた。RGS9-1 は G $\beta$ 5L と常にダイマーを形成し、これがタンパク質安定性に影響するとの報告があることから[42]、本研究では常に RGS9-1 と G $\beta$ 5L を同時にトランスフェクションした。また、トランスフェクションに用いる DNA 量はインサートを含まない空ベクターである pcDNA3.1 (+) で補正し、最終 300 ng/well とした。プラスミド DNA 1  $\mu$ g を LipofectAMINE™2000 Reagent 2.5  $\mu$ l と混合し、室温で 30 分間インキュベーションした後培養メディウムに加えて細胞にトランスフェクションした。トラ

ンスフェクション 24 時間後、FCS 0.1%含有 DMEM またはこれに 100 ng/ml PTX を加えたものに置換した。さらに 24 時間後、Tyrode-HEPES solution (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.0 mM MgCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5.6 mM glucose, pH 7.4) に置換し、37°C、10 分間プレインキュベートした後、UK14304 (1 μM)で 60 分間刺激した。その後、上清をアスピレートし、Laemmli サンプルバッファー (75 mM Tris-HCl, 2% SDS, 15% glycerol, 3% 2-mercaptoethanol, 0.003% bromophenol blue, pH 6.8) 100 μl に溶解した。サンプルは 95°Cで 5 分間の加熱変性を行った後、11% SDS-ボリアクリルアミドゲルを用いて定電圧 (100 V) で電気泳動した。その後 2-2-4 に準じた方法によってウェスタンブロッティングを行った。

#### 2-2-4 SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティング

電気泳動後のサンプルを polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜へウェット式トランスファー装置 (MIGHTY SMALL TRANSPHOR, Amersham) を用いてトランスファーした。トランスファーした PVDF 膜を 2%スキムミルク含有 TBST (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) を用いて室温で 1 時間ブロッキングした後、2%スキムミルク含有 TBST で希釈した下記に示した一次抗体でそれぞれ 4°C、一晚インキュベーションを行った。PVDF 膜を TBST で洗浄後、2%スキムミルク含有 TBST で希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体、または抗ウサギ IgG 抗体と室温にて 1 時間インキュベーションした後、化学発光検出キット (ECL™ Western Blotting detection reagent, Amersham) を用いて、HRP と基質により生じた化学発光を化学発光検出フィルム (HyperfilmECL, Amersham) に感光させて検出した。

Anti-ERK polyclonal antibody	600 倍
Anti-p-ERK polyclonal antibody	1000 倍
Anti-HA monoclonal antibody	1500 倍
Anti-HA polyclonal antibody	1000 倍
Anti-FLAG M2 antibody	1500 倍
Anti-myc monoclonal antibody	1500 倍
Anti-myc polyclonal antibody	1000 倍
Anti-Flotillin-2 monoclonal antibody	2000 倍
Anti-G $\alpha_i$ polyclonal antibody	1500 倍

#### 2-2-5 ショ糖密度勾配遠心法

ショ糖密度勾配遠心法は、[47]を参考に以下のように行った。すなわち、150 mm ディッシュに COS7 細胞を播種し、80%コンフルエントになるまで培養した後、プラスミド DNA のトランスフェクションを行った。プラスミド DNA は RGS9-1/pcDNA3.1 (+) 1.5  $\mu$ g、R9AP/pcDNA3.1 (+) 3  $\mu$ g、R9AP $\Delta$ C (AA 1-212)/pcDNA3.1 (+) 3  $\mu$ g、G $\beta$ 5L/pcDNA3.1 (+) 3  $\mu$ g をそれぞれ組み合わせて用いた。各種 DNA を組み合わせて混合し、DNA 1 $\mu$ g を FuGENE 3  $\mu$ l と混合し、室温で 30 分間インキュベーションした後、培養メディウムに添加することでトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 24 時間後、細胞をチューブに回収し、Tyrode-HEPES solution で 2 回洗浄した。洗浄した細胞に 1 ml の lysis buffer (0.5 % Triton X-100、50 mM Tris-HCl (pH 7.6)、50 mM NaCl、5 mM EDTA、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、5 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>、1 mM PMSF、10  $\mu$ g/ ml aprotinin、10  $\mu$ g/ ml leupeptin、10  $\mu$ g/ ml antipain) を添加し、超音波処理 (15 秒間隔で 5 秒間の処理を 4 回) をした後、4°C で攪拌しながら 1 時間インキュベートした。この lysate に 60% (w/v) sucrose を溶かした STE buffer (50 mM

Tris-HCl (pH 7.6)、50 mM NaCl、5 mM EDTA、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) 3 ml を加えよくピペティングし、超遠心用のチューブに入れた。その上に、35% (w/v) sucrose を溶かした STE を 4 ml、次いで 5% (w/v) sucrose を溶かした STE を 4 ml 界面を乱さぬように重層した。これを超遠心機 (XL-90、BECKMAN) により SW41Ti ローターを用いて、4°C、200,000 x g、16 時間遠心し、終了後 gradient の上部から 1 ml ずつ採取し、上部より fraction No.1-12 のサンプルとし、-80°C で保存した。

#### 2-2-6 免疫沈降法

COS7 細胞を 60 mm ディッシュに播種し、80%コンフルエントになるまで培養した後、各種プラスミド DNA をトランスフェクションした。プラスミド DNA は HA-RGS9-1/PMH6、HA-RGS9L/pHM6、HA-RGS6/pHM6、HA-RGS7/pHM6、HA-RGS11/pHM6、myc-R9AP/pcDNA3.1 (+)、myc-R9APΔC/ pcDNA3.1 (+) 及び FLAG-Gβ5L/pcDNA3.1 (+)、RGS9-1 FULL/pEGFP-N1、RGS9-1 D/pEGFP-N1、RGS9-1 DI/pEGFP-N1、RGS9-1 I/pEGFP-N1、RGS9-1 GR/pEGFP-N1 を用いた。DNA 量は HA-RGS11/pHM6 は 250 ng、HA-RGS9-1/PMH6、HA-RGS9L/pHM6、myc-R9AP/pcDNA3.1 (+)、myc-R9APΔC/pcDNA3.1 (+) 及び FLAG-Gβ5L/pcDNA3.1 (+) はそれぞれ 500 ng、HA-RGS6/pHM6、HA-RGS7/pHM6 はそれぞれ 1 μg、RGS9-1 FULL/pEGFP-N1、RGS9-1 D/pEGFP-N1、RGS9-1 DI/pEGFP-N1、RGS9-1 I/pEGFP-N1、RGS9-1 GR/pEGFP-N1 はそれぞれ 1.5 μg 用いた。各種 DNA を組み合わせて混合し、DNA 1 μg に対して FuGENE 3 μl の割合で混合し、室温で 30 分間インキュベーションした後、培養メディアウムに添加することでトランスフェクションを行った。

トランスフェクションから 24 時間後、細胞を Tyrode-HEPES solution で 3

回洗浄した。洗浄した細胞を 400  $\mu$ l の lysis buffer (150 mM NaCl, 0.1% NP40, 1 mM PMSF, 0.01% aprotinin, 20  $\mu$ g/ml leupeptin, 20 mM Tris/HCl, pH 7.4) で 1.5 ml チューブに回収し、23G の注射針で 10 回出し入れすることにより細胞を剪断した。得られた lysate を 4°C で 1 時間回転させながらインキュベーションを行った。その後、4°C、15,000 x g で 15 分間遠心し、破碎しきれなかった断片を除去し、上清を回収した。次に、lysis buffer で予め平衡化した 20  $\mu$ l のアガロースビーズ結合抗 myc-抗体を加えて 4°C で一晩インキュベーションを行った。上清を回収後、lysis buffer でアガロースビーズを 5 回洗浄し、サンプルバッファーを加え 95°C で 5 分間熱処理を行った。その後、電気泳動 (11% SDS-PAGE) し、2-2-4 に準じた方法によってウェスタンブロッティングを行った。

#### 2-2-7 遺伝子配列相同性解析

本研究で用いた各 R7-RGS の遺伝子配列を NCBI (National Center for Biotechnology information) のウェブサイトからダウンロードし、これらを遺伝子配列解析ソフト (Genetyx Win ver 4) を用いて相同性解析を行った。用いた遺伝子配列 mouse RGS6 (Gene bank accession number AF10761)、human RGS7 (AF49393)、mouse RGS9-1 (AAC99481)、human RGS9-L (AF493933)、human RGS11 (AF035153) である。

#### 2-2-8 試薬

用いた試薬及び購入先は以下のとおりである。0.45% グルコース含有 DMEM、FCS、UK14304、抗 FLAG M2 抗体、抗 HA 抗体 (rabbit) は Sigma Aldrich Japan から購入した。DMEM はニッスイから購入した。アガロースビーズ結合抗 myc モノクローナル抗体 c-myc (9E10) は Santa Cruz Biotechnology から購



入した。抗 GFP 抗体 (mouse) は Clontech から購入した。LipofectAMINE™2000 Reagent、抗 myc 抗体 (mouse) は Invitrogen より購入した。抗 ERK1/2 抗体 (rabbit)、抗 p-ERK1/2 抗体 (rabbit)、抗 flotillin-2 抗体 (mouse) は Celluler Signaling technology から購入した。FuGENE 6 Transfection Reagent は Roche から購入した。その他の試薬については市販の特級試薬あるいはそれに準ずるものを用いた。

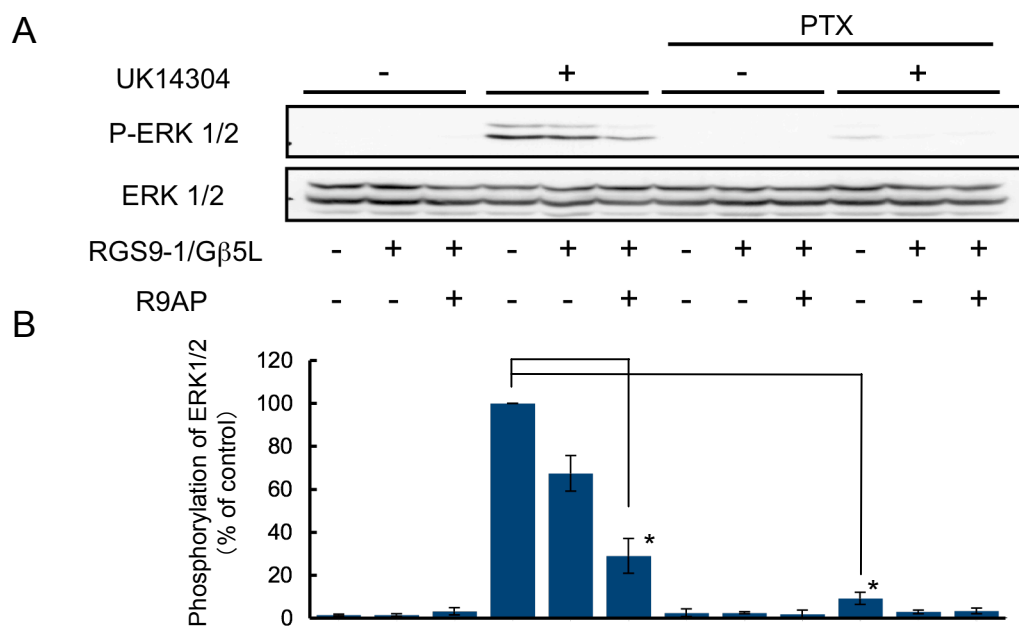
#### 2-2-9 データ解析

実験結果については、平均値 (mean) ± 標準誤差 (S.E.) で示し、有意差検定は Tukey の多重比較法を用いて解析した。

## 2-3 結果

### 2-3-1 G<sub>i/o</sub> シグナルを介した extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) のリン酸化に対する RGS9-1 及び、R9AP 発現の影響

RGS9-1 の GAP 活性に対する R9AP の促進作用は、*in vitro* の再構成実験での報告はあるが[37]、細胞レベルにおいては報告されていない。神経系モデル細胞として知られる NG108-15 細胞には、G<sub>i/o</sub> 関連型のアドレナリン $\alpha_2$  受容体が発現している[48]。RGS9-1 は *in vitro* の系において G $\alpha_t$  以外の G<sub>i/o</sub> ファミリーに対しても GAP 活性を示すことが報告されていることから[37]、細胞レベルにおける G<sub>i/o</sub> シグナルに対する RGS9-1 の作用とこれに対する R9AP の役割について解明することを試みた。NG108-15 細胞に HA 標識 RGS9-1/PMH6 (HA-RGS9-1)、FLAG 標識 G $\beta_5$ L/pcDNA3.1 (+) (FLAG-G $\beta_5$ ) 及び myc 標識 R9AP/pcDNA3.1 (+) (myc-R9AP)を一過性に発現させ、 $\alpha_2$  受容体アゴニストである UK14304 (1  $\mu$ M) で 2 分間刺激した時に惹起される extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) のリン酸化反応を G<sub>i/o</sub> を介するシグナルの指標とし、これに対する RGS9-1、R9AP による影響を検討した (Fig. 2-2)。ベクターのみをトランスフェクションした細胞では、UK14304 刺激により ERK1/2 のリン酸化が確認されたが、この作用が PTX 前処理により抑制されたことから、G<sub>i/o</sub> 依存的な反応であることを確認した。一方、UK14304 による ERK1/2 リン酸化は RGS9-1/G $\beta_5$ L 発現により有意ではないが僅かに抑制する傾向がみられた。さらに R9AP を共発現させると、ERK1/2 リン酸化は顕著に抑制された。また、RGS9-1/G $\beta_5$ L および RGS9-1/G $\beta_5$ L/R9AP の発現は、静止状態における ERK1/2 リン酸化状態には影響をもたらさなかった。

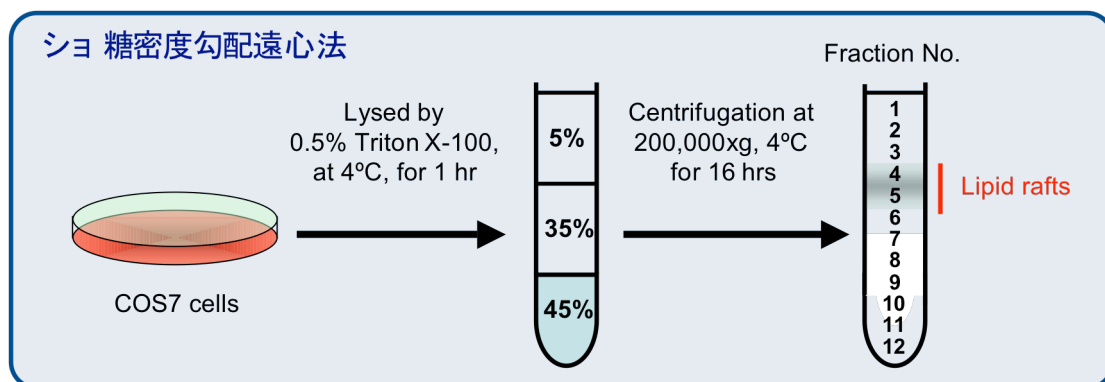


**Fig. 2-2 Effects of R9AP and RGS9-1 on UK14304-induced ERK1/2 phospholylation in NG108-15 cells.** (A) NG108-15 cells were transfected with HA-RGS9-1/FLAG-Gβ5L or HA-RGS9-1/FLAG-Gβ5L/Myc-R9AP or empty vector (pcDNA3.1+). Twenty-four hrs after transfection, cells were pretreated with or without 100 ng/ml PTX for 24 hrs, and then they were stimulated with UK14304 (1 μM) for 2 min. Each sample was separated by 11% SDS-PAGE, and Western blotting was performed using anti-phosphoERK1/2 antibody and anti- ERK1/2 antibody. A typical blot is shown from three independent experiments. (B) Phosphorylation of ERK1/2 is expressed as percentage of the phosphorylation to UK14304 alone. Each column represents the mean with S.E. of three determinations. \*Significant difference from control (P<0.05).

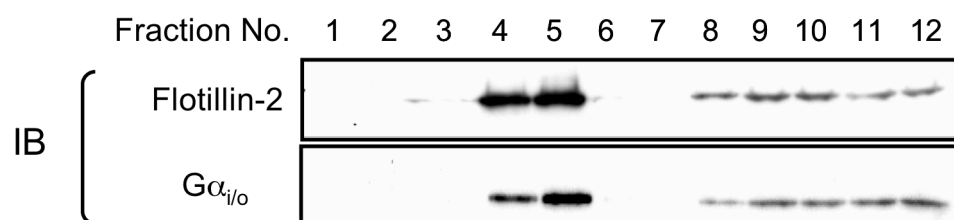
### 2-3-2 脂質ラフト画分における $G\alpha_{i/o}$ 局在性の検討

次にRGS9-1のターゲットとなる  $G\alpha_{i/o}$  の脂質ラフトへの集積を検討するために、脂質ラフトの解析において汎用されるショ糖密度勾配遠心法により、脂質ラフト画分の単離を行った。この方法において、脂質ラフト画分はショ糖の低密度と中密度画分の境界域に回収されるが、超遠心後のチューブ内にはショ糖の境界に対応する4、5フラクションにかすかなくもりが観察され、この中に脂質ラフトに集積しているタンパク質や脂質が回収されてくる (Fig. 2-3A)。そこで、本方法を用いて COS7 細胞から脂質ラフト画分を分画し、脂質ラフトマ

A



B



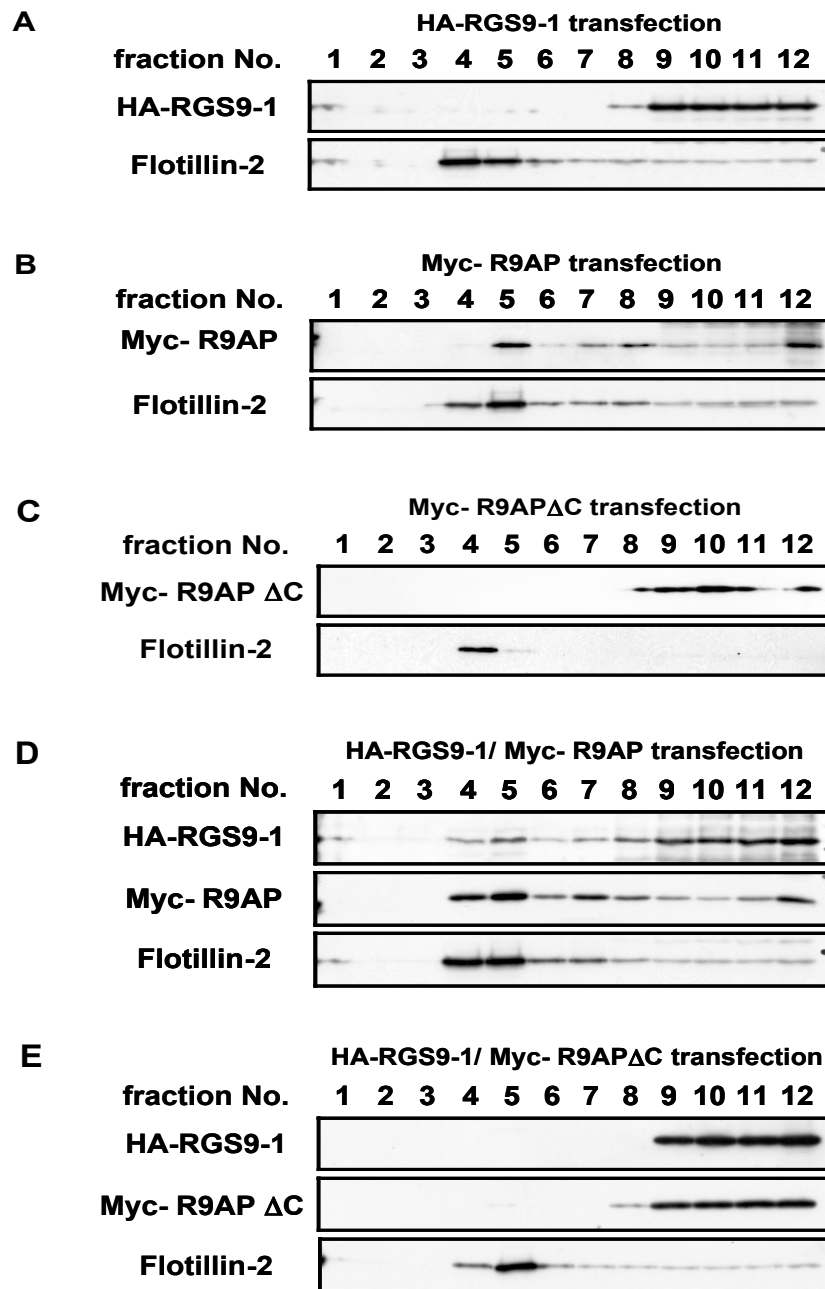
**Fig. 2-3 Localization of  $G_{i/o}\alpha$  in the lipid rafts separated from COS7 cells.** COS7 cells were subjected to isolate lipid rafts by sucrose density ultracentrifugation. (A) Equal volume of each fraction was separated by 11% SDS-PAGE (B) Westernblotting (WB) was performed using anti-flotillin-2 antibody and anti- $G\alpha_{i/o}$  antibody. A representative result was shown from three independent experiments.

一カー分子である flotillin-2 と RGS9-1 のターゲットである  $G\alpha_{i/o}$  をウェスタンブロットティング法により検出した。

その結果、脂質ラフトマーカーである flotillin-2 は、4、5 フラクシオンに集積していることが観察され (Fig. 2-3B)、脂質ラフトが 4 及び 5 フラクシオンに回収されていることを確認した。さらにこのとき、flotillin-2 と同様に、RGS9-1 のターゲットである  $G\alpha_{i/o}$  も 4、5 フラクシオンに極めて濃いバンドとして観察され、既存の報告[41]に一致して COS7 細胞においても脂質ラフト画分に集積していることを確認した。

### 2-3-3 RGS9-1 及び R9AP の脂質ラフトへの局在性の検討

次に、RGS9-1 及び R9AP の脂質ラフトへの局在を検討した。HA-RGS9-1、myc-R9AP の cDNA を単独あるいは共にトランスフェクションした COS7 細胞から、ショ糖密度勾配遠心法により脂質ラフト画分を分画してウェスタンブロッティングを行った。その結果、HA-RGS9-1 のみを発現させた場合、HA-RGS9-1 は脂質ラフト画分である 4、5 フラクシオンには集積しなかった (Fig. 2-4A)。一方、myc-R9AP は単独で脂質ラフト画分に集積していることが明らかになった (Fig. 2-4B)。前述のように、R9AP の C 末端には疎水性アミノ酸に富んだ膜貫通部位が存在する。そこで、R9AP の脂質ラフト画分への集積に膜貫通部位が関与しているか検討するため、C 末端の膜貫通部位を欠損した変異体である myc 標識 R9AP (myc-R9AP $\Delta$ C) をトランスフェクションし、脂質ラフト画分への局在について検討した。その結果、myc-R9AP $\Delta$ C は脂質ラフト画分である 4、5 フラクシオンに集積が認められなかったことから (Fig. 2-4C)、R9AP の脂質ラフトへの局在は C 末端膜貫通部位の関与が示唆された。一方、RGS9-1 と R9AP は強固に複合体を形成することから、これによって R9AP が RGS9-1 の局在を脂質ラフトへと導く可能性が考えられる。そこで、R9AP を介した RGS9-1 の脂質ラフトへの局在を検討するために、HA-RGS9-1、myc-R9AP を COS7 細胞に共発現させ、各々の分子の脂質ラフト画分への局在について検討した。その結果、RGS9-1 は R9AP と共発現させることによって、脂質ラフト画分である 4、5 フラクシオンにも集積が認められるようになった (Fig. 2-4D)。一方、myc-R9AP $\Delta$ C では、RGS9-1 の脂質ラフト画分への集積は見られなかった (Fig. 2-4E)。以上より、RGS9-1 は R9AP を介して脂質ラフトに局在していることが示唆された。



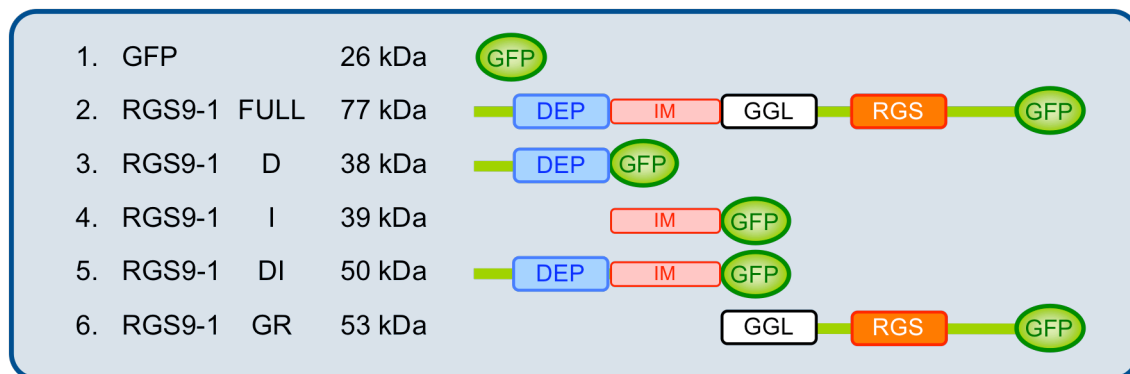
**Fig. 2-4 Localization of RGS9-1 and R9AP in lipid rafts.** COS7 cells were transfected with (A) HA-RGS9-1, (B) myc-R9AP, (C) myc-R9AP $\Delta$ C, (D) HA-RGS9-1 and myc-R9AP or (E) HA-RGS9-1 and myc-R9AP $\Delta$ C. Twenty-four hrs after transfection, cells were subjected to sucrose density ultracentrifugation to isolate lipid rafts. Equal volume of each fraction was separated by 11% SDS-PAGE, and Western blotting was performed using anti-flotillin-2 antibody, anti-HA antibody or anti-myc antibody.

#### 2-3-4 RGS9-1 と R9AP の結合部位の詳細な検討

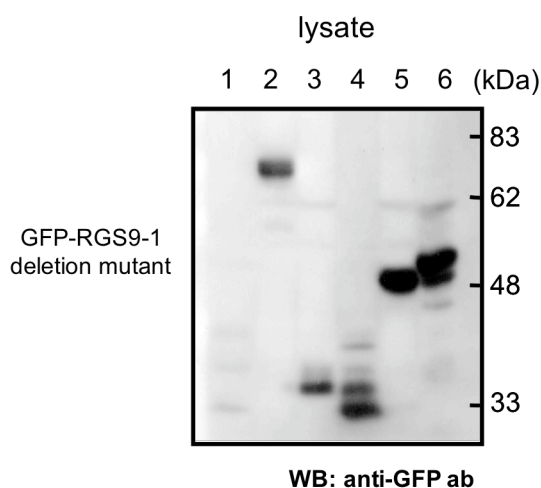
R9AP と RGS9-1 の結合部位における DEP ドメインおよび介在配列の関与について詳細に検討するため、C 末端に GFP (green fluorescent protein) タグを付加した RGS9-1 欠損変異体 (GFP-RGS9-1 欠損変異体) の発現ベクターを作製した (Fig. 2-5A)。作製したベクターは、全長の RGS9-1 (RGS9-1 FULL)、DEP ドメインだけを有する RGS9-1 欠損変異体 (RGS9-1 D)、介在配列 (intermediate domain) だけを有する RGS9-1 欠損変異体 (RGS9-1 I)、DEP ドメインと介在配列を有する RGS9-1 欠損変異体 (RGS9-1 DI)、DEP ドメインと介在配列の両方を欠損した RGS9-1 欠損変異体 (RGS9-1 GR) である。作製した各種 GFP 標識 RGS9-1 欠損変異体を COS7 細胞にトランスフェクションし、抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより発現を確認したところ、それぞれ RGS9-1 欠損変異体と GFP の分子量の和として計算される推定分子量に対応する位置に、タンパク質のバンドが検出されることを確認した (Fig. 2-5B)。

次に細胞レベルにおける各 GFP-RGS9-1 欠損変異体および myc-R9AP との結合性を、共免疫沈降法により検討することを試みた。ここで、すでに R9AP と RGS9-1 との結合には R9AP の細胞内領域が重要であることが知られているため[37]、ここでは myc-R9AP $\Delta$ C を用いて実験を行った。各種 GFP-RGS9-1 欠損変異体および myc-R9AP $\Delta$ C を COS7 細胞にトランスフェクションし、その 24 時間後に細胞を NP40 buffer で可溶化し、抗 myc 抗体を用いた免疫沈降後、抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。その結果 myc-R9AP $\Delta$ C はすべてのサンプルにおいてバンドが検出され、免疫沈降されていることを確認した (データ示さず)。このとき GFP のみでは R9AP との相互作用は見られないことから、RGS9-1 と R9AP との結合の特異性を確認した

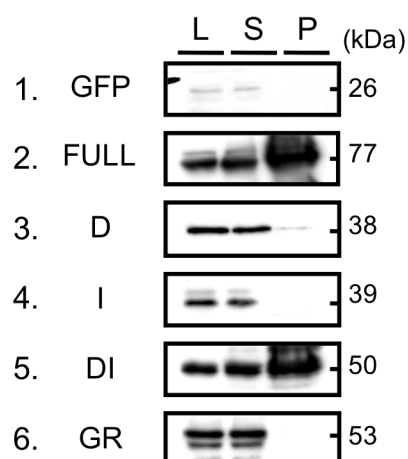
A



B



C



**Fig. 2-5 The binding of R9AP to RGS9-1 deletion constructs.** (A) Schematic structure of the RGS9-1 deletion mutants. DEP, Disheveled/EGL10/Pleckstrin domain; IM, intermediate domain; GGL, G protein  $\gamma$ -subunit like domain; RGS, RGS domain (see Experimental Procedures for exact boundaries of each construct). Each construct contains an C-terminal GFP tag. RGS9-1 Full, full length RGS9-1; RGS9-1 D, DEP domain of RGS9-1; RGS9-1 I, intermediate domain of RGS9-1; RGS9-1 DI, DEP domain and intermediate domain of RGS9-1; RGS9-1 GR, GGL domain and RGS domain of RGS9-1. (B) Expression of each GFP-RGS9-1 deletion constructs in cell lysates. COS7 cells were transfected with each GFP-RGS9-1 deletion constructs. Western blotting was performed by anti-GFP antibody in each cell lysate. (C) Co-immunoprecipitation was performed by anti-myc antibody, and Western blotting was performed by anti-GFP antibody. L, total cell lysate; S, supernatant after immunoprecipitation; P, pellet after immunoprecipitation.

(Fig. 2-5C1)。また、全長 RGS9-1 は従来の報告通り [34, 35]、R9AP と共沈することを確認した (Fig. 2-5C2)。以前、RGS9-1 の R9AP との結合には DEP ドメインが重要であると報告されてきたが、DEP ドメインだけ、あるいは介在配列



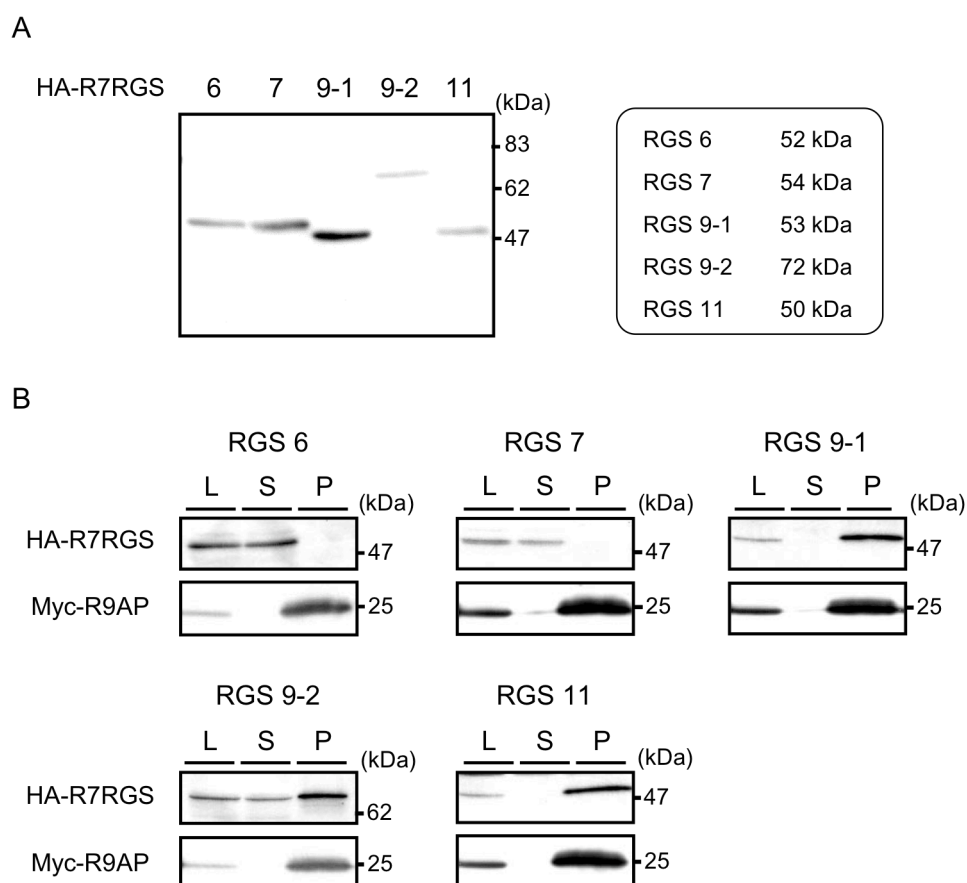
だけを有する RGS9-1 欠損変異体は R9AP と共沈せず (Fig. 2-5C3、4)、DEP ドメインと介在配列の両方をもつ欠損変異体 (Fig. 2-5C5) では R9AP との相互作用が観察された。さらに、DEP ドメイン、介在配列の両方を欠損した変異体では (Fig. 2-5C6)、R9AP とは共沈しなかった。以上のことから、R9AP と RGS9-1 との結合には DEP ドメインだけでは不十分であり、DEP ドメインおよび介在配列両方の関与が示唆された。

### 2-3-5 R7-RGS と R9AP の結合性検討

2-3-4 で RGS9-1 と R9AP との結合には、DEP ドメインのみならず介在配列の重要性が考えられた。一方、各 R7-RGS のアミノ酸配列の相同性解析をしたところ、DEP ドメインから RGS ドメインに至るまで全般的に良く保存されているが、この中で RGS6 および RGS7 には介在配列の部分にさらに二十数個のアミノ酸が挿入されていることが明らかになった (Fig. 2-1)。そこで RGS9-1 以外の R7-RGS と R9AP との結合性についても検討することにより、RGS9-1 と R9AP との結合領域についての詳細な情報を得ることを試みた。すなわち COS7 細胞に HA 標識した各種 R7-RGS 及び myc-R9AP $\Delta$ C をトランスフェクションし、抗 myc 抗体を用いた免疫沈降、さらに抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、両者の相互作用について解析した。

その結果、各種 R7-RGS をトランスフェクションした細胞において、それぞれ推定分子量にバンドが検出されることを確認した (Fig. 2-6A)。一方、全ての沈降物中に myc-R9AP $\Delta$ C のバンドが検出され、myc-R9AP $\Delta$ C が免疫沈降されていることを確認した (Fig. 2-6B)。また、R7-RGS のうち、2-3-4 に示した RGS9-1 のみならず RGS9-2、RGS11 も R9AP と共沈することが明らかになっ

たが、RGS6、RGS7 では R9AP との相互作用は見られなかった (Fig. 2-6B)。以上の結果より、R9AP は RGS9-1 以外にも RGS9-2、RGS11 と結合することが明らかになった。介在配列の長さが RGS9-1 と同程度である RGS11 が R9AP と結合するのに対し、介在配列の長さがより長い RGS6 及び RGS7 では結合が見られなかったことから、R9AP と RGS9-1 の結合には、RGS9-1 中の DEP ドメインのみならず介在配列も重要であることが示唆された。



**Fig. 2-6 Co-immunoprecipitation of R9AP with R7-RGS family.** (A) COS7 cells were co-transfected with myc-R9APΔC and each HA-R7-RGS. Twenty four hrs after transfection, cells were solubilized, and Western blotting was performed by anti-HA antibody. (B) The cell lysate was immunoprecipitated with anti-myc antibody, and Western blotting was performed to detect each HA-R7-RGS with anti-HA antibody. L; Total cell lysates, S; Supernatant after immunoprecipitation, P; Immunoprecipitates.

## 2-4 考察

本章ではまず、細胞レベルにおける  $G_{i/o}$  シグナルに対する RGS9-1 の GAP としての作用と、これに対する R9AP の役割について、アドレナリン $\alpha_2$ 受容体を介した ERK1/2 のリン酸化を指標にして検討を行った。さらに、脂質ラフトに対する  $G_{\alpha_{i/o}}$ 、RGS9-1、R9AP の局在について検討することにより、RGS9-1 の GAP 機能に対する R9AP の促進作用機構について明らかにすることを試みた。

NG108-15 細胞をアドレナリン $\alpha_2$ 受容体の選択的アゴニストである UK14304 で刺激したところ、PTX 感受性の ERK1/2 のリン酸化が起こったことから、この ERK1/2 リン酸化は  $G_{i/o}$  を介して生じる反応であることを確認した (Fig. 2-2)。RGS9-1 をトランスフェクションした細胞では ERK1/2 のリン酸化を僅かに抑制する傾向がみられたが有意な差ではなかった。一方、R9AP を RGS9-1 と共に共発現させることによって UK14304 刺激によるリン酸化の抑制作用は顕著に現れた。以前 Hu ら[37]は人工的に作製した脂質二重層の小胞に、精製した R9AP、RGS9-1、rhodopsin、 $G_{\alpha_t}$  などのタンパク質を再構成し、視細胞モデルを作製した。この *in vitro* 視細胞モデルにおいて R9AP が RGS9-1 の GAP 活性を増強することを報告しているが、本研究において得られた結果は、Hu らによって報告された *in vitro* での R9AP による RGS9-1 の GAP 活性促進作用が、実際に細胞レベルにおいても起こっていることを示している。一方、R9AP それ自身では GAP 活性を持たないことから[35]、R9AP の GAP 活性促進機構として、これまでは RGS9-1 を細胞膜に固定することによって考えられてきた。本研究ではさらに踏み込んで、R9AP は RGS9-1 の局在を細胞膜中の脂質ラフトへ固定することを明らかにした。Neblt らは R7-RGS のターゲットである  $G_{\alpha_{i/o}}$  が細胞膜サブドメインである脂質ラフトに局在することを報告している[41]。実際、本研究においても彼らの報告通り、 $G_{\alpha_{i/o}}$  はそのほとんどが脂

質ラフト画分に集積することが確認できた (Fig. 2-3B)。このことから、 $G\alpha_{i/o}$  を標的とする RGS9-1 も脂質ラフトに局在し、機能を発現する可能性が考えられた。そこで COS7 細胞に HA-RGS9-1 および myc-R9AP を一過性に発現させた後、ショ糖密度勾配遠心法により脂質ラフト画分の単離を行い、RGS9-1 および R9AP が脂質ラフト画分に集積しているか検討を行った。その結果、RGS9-1 単独では脂質ラフト画分に集積しなかった (Fig. 2-4A)。一方、R9AP は単独でも脂質ラフトに局在することが観察された (Fig. 2-4B)。脂質ラフトに集積するタンパク質としては、脂質修飾や GPI アンカーを有する分子が数多く報告されている[49-51]。しかし、RGS9-1 はこのような翻訳後修飾はされていないことが報告されており[52]、本研究において RGS9-1 が脂質ラフト画分に集積しなかった結果はこの報告と一致する。一方、R9AP は C 末端の膜貫通部位を介して細胞膜に存在することが報告されている[34, 37]。Fig. 2-4B に示すように、全長 R9AP は脂質ラフト画分への集積が見られたが、R9AP $\Delta$ C では集積していなかったことから (Fig. 2-4C)、R9AP の脂質ラフトへの局在において膜貫通部位の存在が必要であることが示唆された。さらに、RGS9-1、R9AP を共発現させると、RGS9-1、R9AP 共に脂質ラフト画分への集積が観察されるようになった (Fig. 2-4D)。すなわち、RGS9-1 単独では脂質ラフトに局在することができないが、R9AP が存在すると複合体を形成する結果、脂質ラフトに局在することが可能になったためと思われる。これに対し、R9AP $\Delta$ C には RGS9-1 の局在への影響は見られなかった (Fig. 2-4E)。このことは、R9AP が膜貫通部位を介して脂質ラフトに集積すること、さらに RGS9-1 の局在が R9AP により決定され、脂質ラフトへと移行することを示している。しかしながら、R9AP が脂質ラフトを認識して局在する際、どのような局在シグナルにより規定されているのかについては今後の検討が必要であると考えられる。

これらの結果から、R9AP の RGS9-1 活性促進機構は、RGS9-1 を脂質ラフト

に集積させることにより  $G\alpha_{i/o}$  と位置的に接近して会合する確率を上昇させ、 $G\alpha_{i/o}$  に対して効率よく GAP 活性を示すことが可能になるためと考えられる。

脂質ラフトは動的ダイナミックに生成と崩壊を繰り返すことが知られ、さらに脂質ラフトに局在するタンパク質の中には、刺激により着脱が制御されるタンパク質も数多く報告されている[53]。本研究では、静止状態における RGS9-1 と R9AP の脂質ラフトへの局在性を検討したが、 $G_{i/o}$  を介するシグナルによって RGS9-1、R9AP の脂質ラフトへの局在性が変化を起こす可能性も考えられる。また、PKC、PKA などのキナーゼが脂質ラフトに局在することも報告されており[54, 55]、RGS9-1 の GAP 活性に PKC、PKA などのシグナル分子によるリン酸化が関与している可能性も考えられる。今後さらなる検討によって、R9AP を介する RGS9-1 の活性調節機構が明らかになるものと思われる。

以前 Hu ら[37] は、GGL ドメインより N 末端側を欠損させることによって GAP 活性に対する R9AP の影響が見られなくなることを報告し、R9AP との結合には DEP ドメインが重要であると考察している。しかし、この場合、欠損部位には DEP ドメインと介在配列が含まれるため純粋に DEP ドメインの影響を見ているわけではない。そこで本章では、R9AP に対する RGS9-1 の結合部位の詳細を明らかにするために、各種 RGS9-1 欠損変異株を作製し (Fig. 2-5A)、共免疫沈降法によりそれぞれの R9AP との結合性を検討した。

COS7 細胞に myc-R9AP $\Delta$ C と各種 GFP-RGS9-1 欠損変異体を共発現させ、抗 myc 抗体で免疫沈降したところ、全長 RGS9-1 は従来の報告通り R9AP と共沈することを確認した (Fig. 2-5B)。一方、DEP ドメインと介在配列だけを有する欠損変異体は全長 RGS9-1 同様 R9AP と共沈したが、DEP ドメインだけを有する欠損変異体は共沈しなかった (Fig. 2-5B)。この結果から、これまでの報告とは異なり、DEP ドメインだけでは R9AP への結合性がないことが示唆された。さらに、介在配列だけを有する欠損変異体、及び DEP ドメインと介在配列を欠

損した欠損変異体は共沈しなかった (Fig. 2-5B)。このことは、R9AP との結合には DEP ドメインと介在配列の両方が必要であることを示している。これまで R7-RGS 機能における介在配列の意義については不明であったが、本研究により、介在配列は DEP ドメインと共に R9AP との相互作用に重要であることが示唆された。しかし、今回のような欠損変異体を用いて結合性を検討する際には、細胞の中で本来のドメイン構造を再現していることが前提となる。このため、RGS9-1 と R9AP の結合部位の同定には点変異体を作製し、より詳細な検討が必要であると考えられる。

一方、Fig. 2-1 に示す通り、R7-RGS ファミリーは各ドメインが非常に高い相同性を保存している。しかし、RGS6、RGS7 の介在配列は他の R7-RGS に比べると二十数塩基長い。Fig. 2-5B において DEP ドメインに加え、介在配列も R9AP との結合性に関与することが示唆されたことから、5 種類の R7-RGS と R9AP との結合性を明らかにすることで、RGS9-1 の結合部位の詳細を検討することを試みた。

COS7 細胞に myc-R9AP $\Delta$ C と各種 R7-RGS を共発現させ、抗 myc 抗体で免疫沈降したところ、従来報告されていた RGS9-1 の R9AP との共沈が確認された。さらに RGS9-2、RGS11 は R9AP と共沈したが、RGS6、RGS7 は R9AP と共沈しなかった。他の R7-RGS よりも介在配列が長い RGS6、RGS7 が R9AP と結合しなかったことは、2-3-4 の結果と同様、R9AP との結合に、介在配列が影響していることを示唆している。RGS6 と RGS7 は長い介在配列を有し、それが立体構造の違いを生むことで R9AP との親和性を減少させている可能性がある。R9AP は網膜特異的に局在していることが報告されてきたが[37]、最近、トリやマウスの中枢神経系においても発現していることが報告されていることから[36]、RGS9-2、RGS11 は中枢神経系において、RGS9-1 同様、R9AP によって GAP 活性が制御されていることが考えられる。

また R7-RGS を制御する分子として、R9AP の他、最近になって R7BP が報告された[56-58]。この分子も GGL ドメインより N 末側の DEP ドメインを含む領域で R7-RGS と結合することが報告されている[56-58]。このことから、DEP ドメインおよび介在配列は、R7BP に対する結合部位として機能している可能性が考えられる。今後、この情報を元に新たな R7-RGS 制御分子の探索が期待される。本研究の成果は、中枢神経系における R7-RGS ファミリーを介した新たな G タンパク質制御機構の解明に貢献できるものと考えられる。

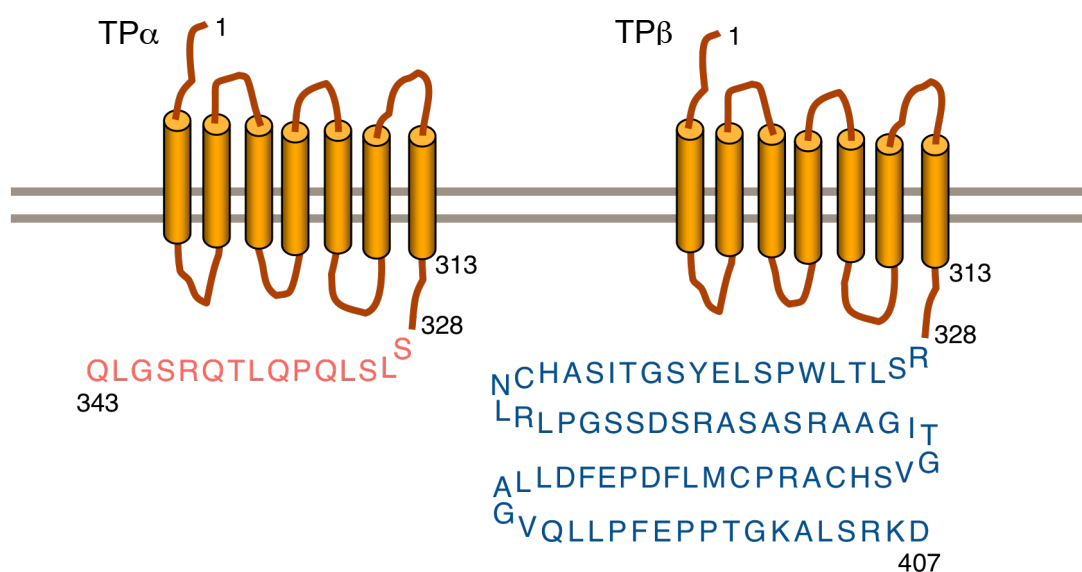
## 第 3 章 TXA<sub>2</sub> 受容体 (TP) 新規会合タンパク質 TP interacting protein (TPIP) の機能解析

### 3-1 序論

トロンボキサン A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) は血管及び気管支平滑筋の収縮、血管平滑筋の増殖、血小板の凝集を引き起こすアラキドン酸代謝物である[59]。また近年、TP ノックアウトマウスでは外来抗原に対する免疫応答が増強していたことから、TP の免疫系における役割が示唆されている[60]。これらの生体応答は TXA<sub>2</sub> が特異的に結合する TXA<sub>2</sub> 受容体 (TP) を介して引き起こされる。TP は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一つであり、三量体 G タンパク質の中でも G<sub>q/11</sub> と関連してホスホリパーゼ C (PLC) を活性化させ、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇や、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化を引き起こすことがよく知られている[61-63]。さらに、TP は G<sub>12</sub>、G<sub>13</sub>、G<sub>i</sub>、G<sub>s</sub> 及び G<sub>h</sub> とも関連することが報告されており[63-65]、それにより様々なシグナル経路を活性化させる。

ヒト TP は一つの遺伝子として発見されたが、多くの他の GPCR と同様にスプライシングバリエーションが存在する。TP $\alpha$  はヒト胎盤細胞から初めてクローニングされたことから placental type と呼ばれ、343 アミノ酸から構成されている[66]。一方、TP $\beta$  はヒト内皮細胞から初めてクローニングされたことから endothelial type と呼ばれ、407 アミノ酸から構成されている[67]。TP $\alpha$  と TP $\beta$  は初めの 328 アミノ酸は共通の配列であり、C 末端部分の配列のみが異なっている (Fig. 3-1)。すなわち、細胞外の N 末端から 7 回目の膜貫通領域まで同一であることからリガンド結合部位は TP $\alpha$ 、TP $\beta$  共に同じであると予想されており[68]、リガンドに対する親和性は TP $\alpha$  と TP $\beta$  との間に差はないことが報





**Fig. 3-1. Amino acid sequence of the C termini of TPα and TPβ.** TPα and TPβ diverge from residue at position 328, and TPβ has a longer C-terminal tail than TPα.

告されている[65, 69]。発見当初は組織特異的なものと考えられていたが、その後の研究からヒト細胞や組織においてTPαとTPβが同時に発現していることも示されている[65]。

近年 GPCR の C 末端には様々な細胞内タンパク質が結合することが報告されている。これらの中には、GPCR の局在を決定する作用や、シグナル分子の足場タンパク質としての作用を持つものが存在し[70, 71]、GPCR 機能制御を考える上で非常に重要であると考えられている。実際、TP と結合し機能を制御する因子もいくつか報告されており、Rab11 もその一つである。Rab11 は輸送に関わる small G タンパク質の一つであるが、Hamelin ら[72]は GDP 結合型 Rab11 の TPβC 末端領域への結合が TPβ の細胞内から細胞表面へのリサイクリングに重要であることを報告している。

以前、TP 活性制御機構の詳細を明らかにするために TP の C 末端に会合するタンパク質を酵母ツーハイブリッド系を用いて探索した。その結果、TPβ の C 末端結合タンパク質としてプロテアソームサブユニット α7、及びプロテアソー

ムアクティベーターPA28 $\gamma$ を同定している[73]。これら二つのプロテアソーム関連タンパク質はTP $\beta$ に直接結合することが示され、TP $\beta$ はプロテアソームにより積極的に分解を受けることが明らかになった[73]。一方、TP $\alpha$ 及びTP $\beta$ のC末端に結合するタンパク質としてKIAA1005を酵母ツーハイブリッド法により見出した。KIAA1005をTPタンパク質としてTP interacting protein (TPIP)と命名したが、その生理的役割、機能については全く未知である。

そこで本章では新規TP結合タンパク質TPIPがTPの機能に与える影響を解明することを目的とし解析を行った。

## 3-2 実験方法

### 3-2-1 細胞培養と TP 安定発現細胞の作製

Chinese hamster ovary (CHO) 細胞及び Human embryonic kidney (HEK) 293 細胞は 10%FCS、1321N1 ヒトアストロサイトーマ細胞は 5%FCS、50 unit/ml ペニシリン及び 50 µg/ml ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM; Nissui) 中で、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内 37°C で培養した。TP、TPIP のトランスフェクションは Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用い、マニュアルに従って行った。CHO 細胞の TP 安定発現細胞の作成にはトランスフェクション二日後に 1/100 の細胞数で播き直し、G418 (Calbiochem) を 600 µg/ml の濃度で加えて培養した。二週間後にそれぞれのネオマイシン耐性 (G418 耐性) クローンを単離し、TP の発現を確認した。

### 3-2-2 プラスミドの作製

myc-TPIP /pcDNA3.1 (+) の作製は myc-pcDNA3.1 (+) をテンプレートとして PCR により作製した。プライマーには制限酵素サイトとしてそれぞれ二つの *Eco*RI 配列を含む、5'-GCGAGGAATTCATGTCTGGTCCAACTGATGAGAC-3' と 5'-GCTACTGAATTCTCAAGCCTCCAAGTCATCTCTG-3' を使用した。PCR は ABI 310 (Applied Biosystems) を用い、PCR 酵素には pfu turbo DNA polymerase (Stratagene) を用いた。得られた PCR 産物は *Eco*RI で切断し、あらかじめ *Eco*RI で切断した pcDNA3.1 (+) とライゲーションした。ライゲーション反応は Quick Ligation kit (New England Biolabs) を用いて室温で 10 分間 インキュベートすることで行った。

FLAG-TP $\alpha$ /CMV4 の作製は成宮 周教授 (京都大学) より供与された wild-type TP $\alpha$  (HPL/pBluescript) を *Bam*HI 及び *Eco*RV で切断し、あらかじ

め *Bam*HI 及び *Eco*RV で切断した FLAG/HMV4 とライゲーションした。FLAG-TP $\beta$ /CMV4 は二つの TP $\beta$  断片を FLAG/HMV4 に組み込み作製した。一つ目の断片は wild-type TP $\alpha$  (HPL/pBluescript) を *Eco*RI 及び *Bsi*HKAI で切り出した。二つ目の断片は 1321N1 ヒトアストロサイトーマ細胞から抽出した RNA を逆転写した cDNA をテンプレートとして用い、PCR することで得た DNA 断片を *Bsi*HKAI 及び *Not*I で切断した。プライマーは 5'-AAAGTCGACAAGAGCCGTGCTCAGGCGTCTCAGCC-3' と 5'-TTGCGGC CGCTCAATCCTTTCTGGACAGAGCCTTCCC-3' を使用した。得られた二つの DNA 断片はあらかじめ *Eco*RI 及び *Not*I で切断した FLAG/HMV4 とライゲーションした。

### 3-2-3 免疫沈降法

HEK293 細胞を 60 mm ディッシュに播種し、80%コンフルエントになるまで培養した後、各種プラスミド DNA をトランスフェクションした。プラスミド DNA は myc-TPIP/pcDNA3.1 (+)、FLAG-TP $\alpha$ /CMV4、FLAG-TP $\beta$ /CMV4 を用いた。DNA 量は myc-TPIP/pcDNA3.1 (+) は 5  $\mu$ g、FLAG-TP $\alpha$ /CMV4、FLAG-TP $\beta$ /CMV4 はそれぞれ 2.5  $\mu$ g 用いた。各種 DNA を組み合わせて混合し、DNA 1  $\mu$ g を LipofectAMINE<sup>TM</sup>2000 Reagent 2.5  $\mu$ l と混合し、室温で 20 分間インキュベーションした後、培養メディウムに添加することでトランスフェクションを行った。

トランスフェクションから 24 時間後、細胞を Tyrode-HEPES solution で 3 回洗浄した。洗浄した細胞を 400  $\mu$ l の lysis buffer (150 mM NaCl, 0.1% NP40, 1 mM PMSF, 0.01% aprotinin, 20 mg/ml leupeptin, 20 mM Tris/HCl, pH 7.4) で 1.5 ml チューブに回収し超音波処理 (15 秒間隔で 5 秒間の処理を 5 回) し、lysate を 4°C で 1 時間回転させながらインキュベートした。その後、4°C、15,000

x g で 15 分間遠心し、破碎しきれなかった断片を除去し、上清を回収した。次に、lysis buffer で予め平衡化した 20  $\mu$ l のアガロースビーズ結合抗 FLAG M2-抗体を加えて 4°C で一晩インキュベーションを行った。上清を回収後、lysis buffer でアガロースビーズを 5 回洗浄し、サンプルバッファーを加え 5 分間超音波処理を行った。その後、電気泳動 (8%、11% SDS-PAGE) し、2-2-4 に準じた方法によってウェスタンブロッティングを行った。

### 3-2-4 Pull-down assay

GST 融合タンパク質の発現には、まず種々のインサートを含む pGEX-5X-2 を大腸菌 BL21 に導入した。得られたコロニーは LB 培地中で大量培養し、isopropyl  $\beta$ -thiogalactoside で発現を誘導した。タンパク質発現が誘導された大腸菌は Protease inhibitor Cocktail (Roche), 10 mM EDTA, 2 mM PMSF を含む buffer A (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) に懸濁し、FRENCH Press により破壊した。FRENCH Press を通した大腸菌懸濁液は 17,400 g で 15 分間、4°C で遠心し、上清を GST 融合タンパク質溶解液とした。myc-TPIP タンパク質は HEK293 細胞に myc-TPIP/pcDNA3.1 (+) をトランスフェクションし buffer B (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1% NP40) 中、4°C で一時間攪拌することで得た。GST 融合タンパク質 (15  $\mu$ g) と myc-TPIP (100  $\mu$ g) を含む HEK293 細胞ライゼートを buffer B 中で混合し、4°C で一晩攪拌した。翌日、buffer B で平衡化した Glutathione-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech) にタンパク質混合物を加え、室温で一時間攪拌した。タンパク質が結合したビーズは buffer B で洗浄した後、buffer B から NP40 を除いた buffer でさらに洗浄し、SDS-sample buffer に溶解させた。

### 3-2-5 RT-PCR

cDNA の合成は ReverTra Ace (TOYOBO) のキットを用い、そのプロトコールに従い行った。RT 反応はまず、1.0  $\mu\text{g}$  の RNA に oligo (dT) 12-18 primer (0.25 pmol/ml) 0.5  $\mu\text{l}$ 、DEPC 水 3.75  $\mu\text{l}$  を混合し、70°C で 10 分間処理し、4°C で冷却した。このサンプルに 5 x RT buffer 2  $\mu\text{l}$ 、10 mM dNTPs mixture 1  $\mu\text{l}$ 、RNase inhibitor (40 units/ml) 0.25  $\mu\text{l}$ 、ReverTra Ace (100 units/ml) 0.5  $\mu\text{l}$  を混合したものを加え、42°C で 60 分間反応を行った。さらに、99°C で 5 分間処理することにより酵素を失活させ、氷冷後 -20°C で保存した。

### 3-2-6 SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティング

SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティングは第 2 章に示した方法に従って行った。

### 2-2-7 U46619 刺激による ERK1/2 リン酸化の検討

TP $\alpha$  及び TP $\beta$  安定発現 CHO 細胞を 12 well plate に播種し、80%コンフルエントになるまで培養した後、myc-TPIP/pcDNA3.1 (+) をトランスフェクションした。また、トランスフェクションに用いる DNA 量はインサートを含まない空ベクターである pcDNA3.1 (+) で補正し、最終 1  $\mu\text{g}/\text{well}$  とした。プラスミド DNA 1  $\mu\text{g}$  を LipofectAMINE<sup>TM</sup>2000 Reagent 2.5  $\mu\text{l}$  と混合し、室温で 30 分間インキュベーションした後培養メディウムに加えて細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後、FCS 0.1%含有 DMEM に置換した。さらに 24 時間後、Tyrode-HEPES solution に置換し、37°C、10 分間プレインキュベートした後、U46619 (1  $\mu\text{M}$ ) で各時間刺激した。その後、上清をアスピレートし、サンプルバッファー 100  $\mu\text{l}$  に溶解した。サンプルは 95°C で 5 分間の加熱変性を行った後、8%、11% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて定電

圧 (100 V) で電気泳動した。その後 2-2-4 に準じた方法によってウェスタンブロッティングを行った。

### 3-2-8 細胞内イノシトールリン酸の定量

細胞内イノシトールリン酸の定量は Nakahata ら[74]の方法に従った。すなわち、CHO 細胞は 60 mm ディッシュ上でトランスフェクションし、翌日に 12 well plate に培養しなおした。このとき、2  $\mu$ Ci/ml の [ $^3$ H]myo-inositol で細胞膜リン脂質を標識した。トランスフェクションから 48 時間後に細胞を Tyrode-HEPES solution で 2 回洗浄し、10 mM LiCl を加えた Tyrode-HEPES solution 中、10 分間 37°C でインキュベートした。細胞はそれぞれの濃度の U46619 及びカルバコールと 20 分間反応させ、buffer を除去後、5%トリクロロ酢酸 (TCA) を加えて反応を停止させた。この TCA 溶液をジエチルエーテルで 3 回洗浄することによって TCA を除き、1 M ギ酸で活性化させた陰イオン交換樹脂 (Dowex AG 1X-8, formate form) を用いて [ $^3$ H]イノシトールリン酸を分離した。すなわち、サンプルをローディングしたカラムは水 6 ml、及び 50 mM ギ酸アンモニウム 6 ml によりイノシトール及びグリセロホスホイノシトールを溶出させた。続いて 1 M ギ酸/0.1 M ギ酸アンモニウム 4 ml により総イノシトールリン酸を分取した。この画分をシンチレーションカクテルと混合し、液体シンチレーションカウンターで [ $^3$ H]放射活性を測定した。

### 3-2-9 [ $^3$ H]SQ29548 結合実験

TP $\alpha$  あるいは TP $\beta$  を安定発現させた HEK293 細胞は氷冷した PBS で二度洗浄し、トリプシンでディッシュから剥がした後に Tyrode-HEPES solution に懸濁させた。1 x 10<sup>6</sup>個の細胞は各種濃度の [ $^3$ H]SQ29548 を含む 200  $\mu$ l の溶液中、4°C で 3 時間インキュベートした。氷冷した washing buffer (10 mM Tris-HCl,

140 mM NaCl, pH 7.4) 4 ml で反応を止め、GC25 filter paper (Advantec) で濾過した。さらに二度洗浄した後、ろ紙に残った $^3\text{H}$ 放射活性を測定した。特異的結合量は、10  $\mu\text{M}$  の過剰な SQ29548 存在下での非特異的結合量を引いた値として得た。

### 3-2-10 1321N1 細胞からの総 RNA 抽出

1321N1 細胞からの総 RNA 抽出は TRI Reagent のキットを用い、そのプロトコールに従い行った。1321N1 細胞を 6 well plate に播種し、80%コンフルエントになるまで培養した後、各濃度の myc-TPIP/pcDNA3.1 (+) をトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後、U46619 1  $\mu\text{M}$  で 4 時間刺激を行った。SQ29548 の処理時間は U46619 刺激 15 分前から処理した。刺激終了後、メディウムをアスピレートして取り除いた後、TRI Reagent 250  $\mu\text{l}$  加え細胞を溶解し 1.5 ml チューブに回収した後、クロロホルムを 50  $\mu\text{l}$  加えチューブをよく振った。室温に 5 分間放置した後、17,400 x g、4°C で 10 分間遠心分離した。別のチューブに水相を回収した後、イソプロパノールを 125  $\mu\text{l}$  加え、5 回反転後室温で 5 分間放置し、17,400 x g、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、70%エタノール 250  $\mu\text{l}$  で洗浄した後、17,400 x g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を完全に除去した。予めジエチルピロカーボネート処理した蒸留水 (DEPC 水) に RNA を溶解し、これを総 RNA 抽出液とした。分光光度計で OD<sub>260</sub> と OD<sub>280</sub> を測定し、DEPC 水を適量加えることにより RNA 濃度を 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  とした。

### 3-2-11 試薬

用いた試薬及び購入先は以下のとおりである。U46619、SQ29548 は Cayman Chemical から購入した。 $^3\text{H}$ SQ29548、myo-  $^3\text{H}$ inositol は Perkin Elmer Life



Sciences から購入した。pFLAG-CMV4、抗 FLAG M2 抗体、アガロースビーズ結合抗体は SIGMA から購入した。ProQuest Two-Hybrid System、human adult brain cDNA library は Invitrogen から購入した。Human total RNA Master Panel II は Clontech から購入した。Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit は Stratagene から購入した。その他の試薬については市販の特級試薬あるいはそれに準ずるものを用いた。

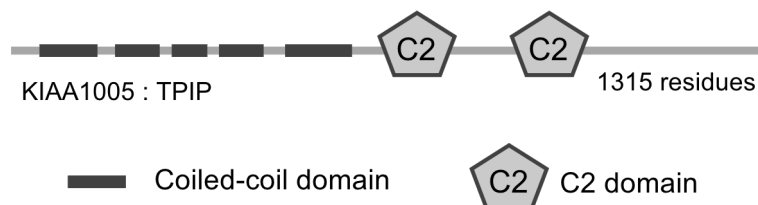
### 3-2-12 データ解析

実験結果については、平均値 (mean) ± 標準誤差 (S.E.) で示し、有意差検定は two-way ANOVA を用いて解析した。

### 3-3 結果

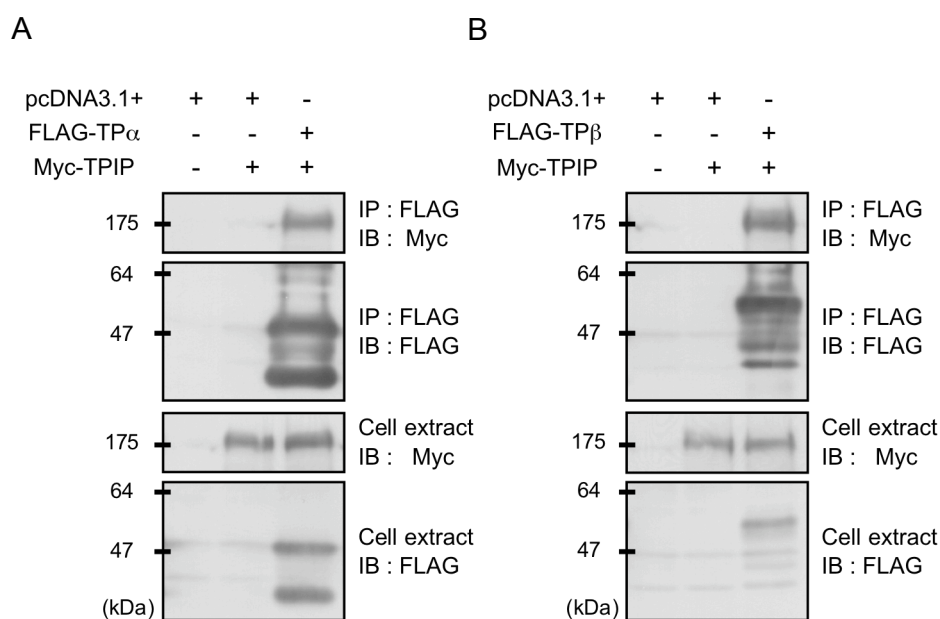
#### 3-3-1 $TP\alpha$ 及び $TP\beta$ と TPIP の会合

酵母ツーハイブリッド法を用いて、ヒト脳 cDNA ライブラリーから  $TP\alpha$ 、 $TP\beta$  の C 末端領域に結合するタンパク質の探索を行った。解析するために  $TP\alpha$  は約  $9.07 \times 10^6$ 、 $TP\beta$  は約  $5.53 \times 10^6$  のクローンを用いた。その結果、 $TP\alpha$  に会合する陽性クローンとして KIAA1005 を見出した (データ示さず)。さらに  $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイによって、KIAA1005 は  $TP\alpha$ 、 $TP\beta$  の C 末端部位と強く会合することが明らかになった (データ示さず)。KIAA1005 は 2005 年に初めて全長がクローニングされた新規タンパク質であり、その機能については研究がされておらず、 $TP\alpha$ 、 $TP\beta$  共に結合する新規タンパク質として見出されたことから、TP interacting protein (TPIP) と命名した。TPIP 遺伝子は第 16 染色体上にコードされており、TPIP タンパク質は 1,315 アミノ酸から構成されている。ドメイン解析ソフトにより TPIP の二次構造予測を行った結果、中央部に 2 つの C2 ドメイン、N 末端側に 5 つのコイルドコイルドメインをもつことが明らかになった (Fig. 3-2)。



**Fig. 3-2. Thromboxane  $A_2$  receptor (TP) interacting protein (TPIP).** The predicted secondary structure of TPIP. There are five coiled-coil domains and two C2 domains.

TPIP は酵母の中で TP 会合タンパク質としてクローニングされたが細胞内でも実際に TP 会合しているか否かを検討する必要がある。そこで、TPIP と TP $\alpha$  及び TP $\beta$  をトランスフェクションした細胞を用いて免疫沈降法を行った。すなわち、HEK293 細胞に myc-TPIP と FLAG-TP $\alpha$  あるいは FLAG-TP $\beta$  を一過性にトランスフェクションして得られた cell lysate を抗 FLAG M2 抗体で免疫沈降し、沈降したタンパク質を SDS-PAGE で分離後、抗 myc 抗体を用いてウェスタンブロッティング法により解析した。その結果、それぞれの沈降物中に FLAG-TP $\alpha$ 、FLAG-TP $\beta$  のバンドが検出されたことから、免疫沈降されていることを確認した (Fig. 3-3)。さらに TPIP は FLAG-TP $\alpha$ 、FLAG-TP $\beta$  の両方と共沈することを確認した (Fig. 3-3)。この結果から、TPIP は細胞内においても TP $\alpha$ 、TP $\beta$  と会合することが示唆された。



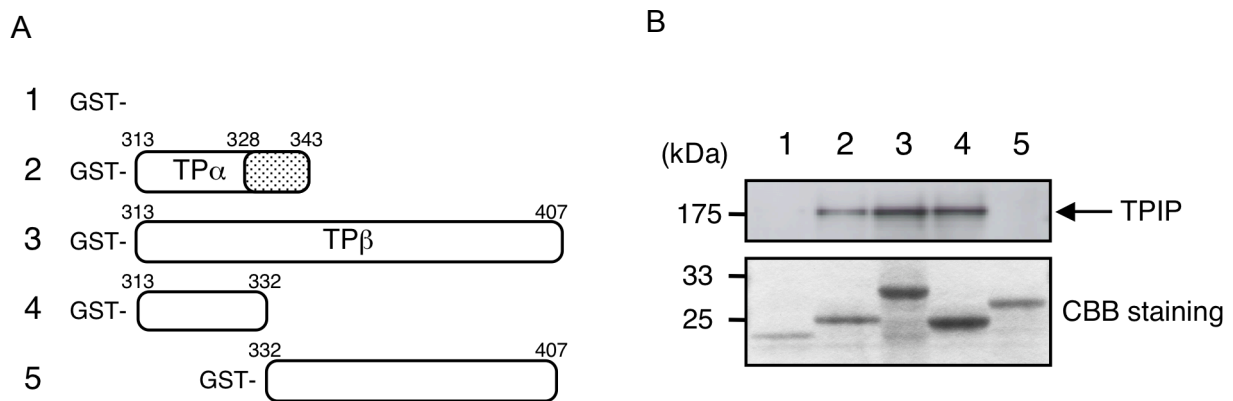
**Fig. 3-3. Thromboxane A<sub>2</sub> receptor (TP) interacting protein (TPIP) and its association with TP $\alpha$  and TP $\beta$ .** HEK293 cells were co-transfected with myc-TPIP and FLAG-TP $\alpha$  (A) or FLAG-TP $\beta$  (B). Twenty-four hrs after transfection, cells were solubilized in RIPA buffer and the FLAG-TP was immunoprecipitated with the anti-FLAG antibody. Western blotting of the immunoprecipitates was performed to detect myc-TPIP with anti-myc antibody and and FLAG-TP with anti-FLAG antibody. Cell extract was also used for detection of TPIP or FLAG-TP.

### 3-3-2 TP $\alpha$ 及び TP $\beta$ の TPIP 結合部位の解析

酵母ツーハイブリッド法及び免疫沈降法により TPIP が TP $\alpha$ 、TP $\beta$  と結合することが明らかになった (Fig. 3-3)。前述した通り TP $\alpha$  と TP $\beta$  の C 末端領域の配列は 328 番目のアミノ酸以降の配列のみが異なる (Fig. 3-1)。以前、酵母ツーハイブリッド法を行う際に bait として用いた TP $\alpha$ 、TP $\beta$  の C 末端配列は 313 アミノ酸以降の配列である。つまり 313 番目から 328 番目までの共通配列を含んでおり、TP $\alpha$ 、TP $\beta$  両方と結合する TPIP はこの領域を認識して結合している可能性が高い。このことから TP $\alpha$ 、TP $\beta$  の詳細な TPIP 結合部位を明らかにする為に、特に 313 番目から 328 番目までの共通配列に注目し、いくつかの GST 融合 TP C 末端部分変異体を用いて pull-down assay を行った。各 GST 融合 TP C 末端部分変異体は大腸菌に導入し、大量にタンパク質を発現させた。GST 融合 TP C 末端部分変異体は TP $\alpha$  の C 末端全長 (TP $\alpha$  313-343)、TP $\beta$  の C 末端全長 (GST-TP $\beta$  313-407)、TP $\beta$  の C 末端 313 番目から 332 番目までのアミノ酸配列 (GST-TP $\beta$  313-332)、及び TP $\beta$  の C 末端 332 番目から 407 番目までのアミノ酸配列 (GST-TP $\beta$  332-407) を用いた。一方で、myc 標識 TPIP を HEK293 細胞にトランスフェクションし、myc-TPIP を含む細胞ライゼートを得た。次に、GST 融合タンパク質及び myc-TPIP 含有細胞ライゼートを混合し、Glutathione Sepharose ビーズを加えた。ビーズには GST 融合タンパク質が結合するが、この GST 融合タンパク質に結合するタンパク質はビーズと共に沈降してくる。このビーズを buffer で洗浄し、結合しないタンパク質を除いた後 SDS sample buffer でビーズに結合しているタンパク質を溶出させ、myc-TPIP の存在をウェスタンブロッティング法により確認した。

その結果、酵母ツーハイブリッド法の結果と同様、TPIP は TP $\alpha$  313-343、TP $\beta$  313-407 と結合することを確認した (Fig. 3-4)。さらに TP $\alpha$ 、TP $\beta$  共通配

列を含む GST-TP $\beta$  313-332 は TPIP と結合したが、それ以降の非共通配列をもつ GST-TP $\beta$  332-407 は TPIP と結合しなかった (Fig. 3-4)。これらの結果から、TPIP は TP $\alpha$ 、TP $\beta$  の C 末端領域共通配列である 313 から 328 番目のアミノ酸領域と結合する可能性が示唆された。

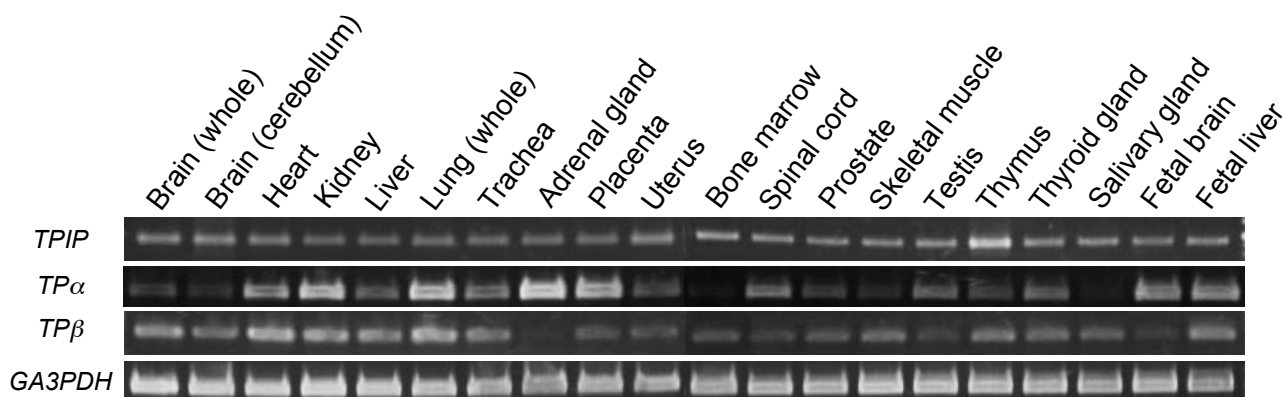


**Fig. 3-4. Binding ability of TP mutants to TPIP.** (A) Composition of GST, GST-TP $\alpha$  and GST-TP $\beta$  mutants expressed in bacteria (nos. 1–5). Dotted area in TP $\alpha$  shows the different amino acid sequence from TP $\beta$ . (B) GST, GST-TP $\alpha$  and GST-TP $\beta$  mutants (a, 1–5) were incubated with myc-TPIP. Myc-TPIP (upper panel) bound to glutathione-sepharose were subjected to 11% SDS-PAGE. The bound proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB, lower panel).

### 3-3-3 TPIP mRNA 組織発現の解析

TPIP は新規タンパク質であり詳細な組織発現パターンは明らかになっていない。TPIP の機能を推測する上で各組織における発現を明らかにすることは非常に重要である。そこで各組織サンプルを用いて、TPIP mRNA、及び、TP $\alpha$ 、TP $\beta$  mRNA の発現パターンを解析した。ヒト組織サンプルとして Human total RNA Master Panel II (Clontech) を用い RT-PCR を行った。得られた cDNA をテンプレートとし PCR を行い、得られたバンドから TPIP mRNA、及び、TP $\alpha$ 、TP $\beta$  mRNA 発現パターンの解析を行った。その結果、TPIP mRNA は胸腺で強

い発現がみられたものの、多くの組織で普遍的に発現していることが明らかになった (Fig. 3-5)。一方、TPIP mRNA と TP $\alpha$ 、TP $\beta$  mRNA は発現が重なる組織も存在するものの、必ずしも発現が一致していないことが示唆された。

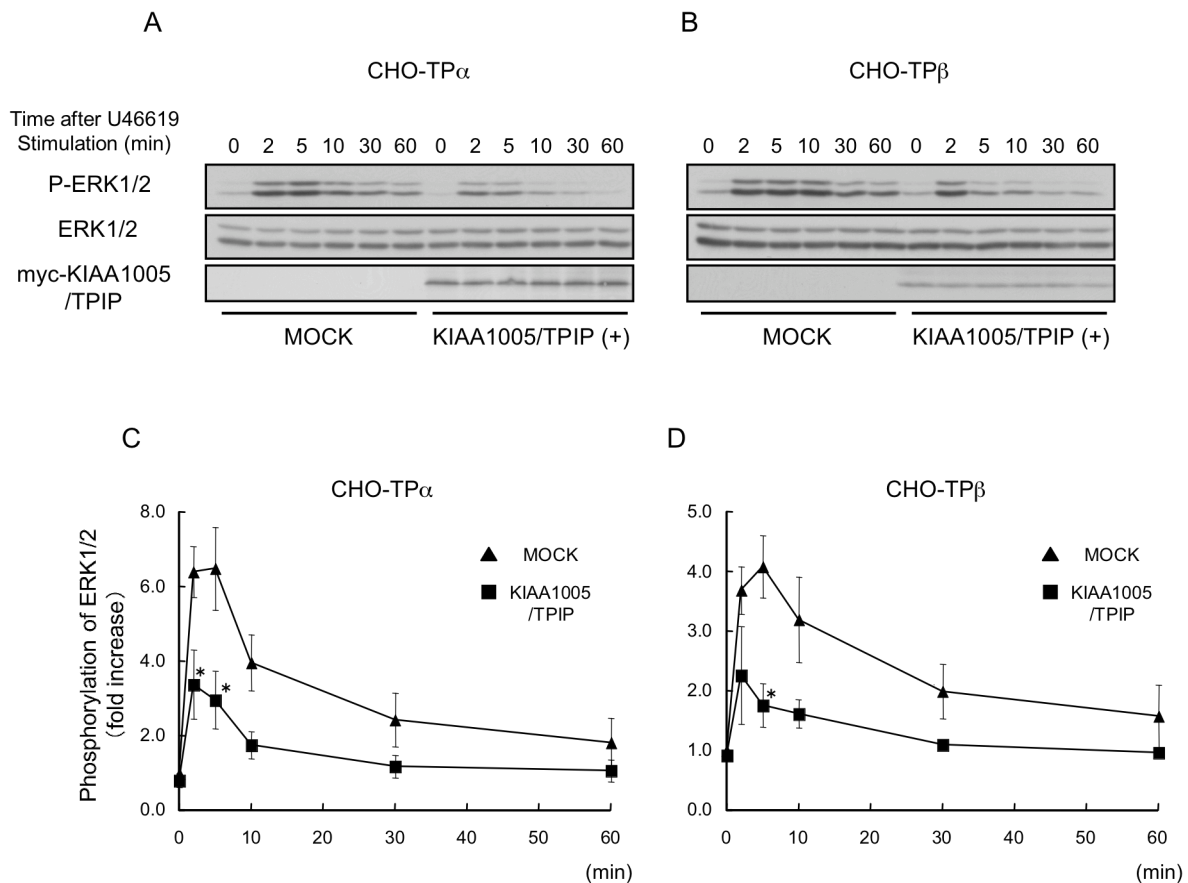


**Fig. 3-5. TPIP mRNA expression in various human tissues.** RT-PCR was performed using products of the Human Total RNA Master Panel II (Clontech) for analysis of TPIP, TP $\alpha$  and TP $\beta$ . cDNA (500 ng) of each tissue was used for the analysis. The ubiquitously expressed glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GA3PDH) gene was used as a positive control.

#### 3-3-4 TP シグナル伝達に対する TPIP 過剰発現の影響

3-3-1 と 3-3-2 で TPIP と TP $\alpha$  及び TP $\beta$  の会合が示されたことから、TPIP は TP を介するシグナル伝達に影響を及ぼしている可能性が大いに考えられる。そこで TP を介する様々なシグナルに対して TPIP 過剰発現がどのような影響を及ぼすのか検討を行った。いくつかの細胞で TP アゴニストである U46619 で刺激すると extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 のリン酸化が引き起こされることが知られている[75, 76]。そこで TP $\alpha$  を安定発現させた CHO 細胞 (CHO-TP $\alpha$  細胞)、及び TP $\beta$  を安定発現させた CHO 細胞 (CHO-TP $\beta$  細胞) を用いて U46619 誘発性 ERK1/2 のリン酸化に対する TPIP 過剰発現の影響を検

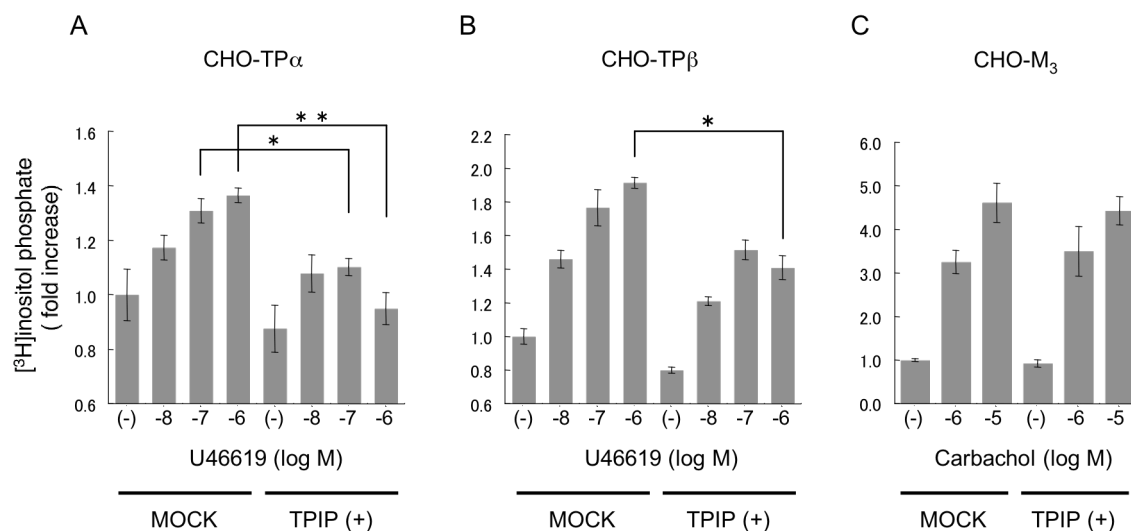
討した。すなわち、CHO-TP $\alpha$  細胞または CHO-TP $\beta$  細胞に myc-TPIP 及び pcDNA3.1 (+) をトランスフェクションし、U46619 (1  $\mu$ M) で各時間刺激した後 SDS sample buffer に溶解し、抗 pERK1/2 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により解析した。その結果、pcDNA3.1 (+) のみをトランスフェクションした細胞では、U46619 刺激により TP $\alpha$ -CHO 細胞、TP $\beta$ -CHO 細胞共に 2 分から 10 分をピークとする ERK1/2 のリン酸化が確認された。一方、TPIP を



**Fig. 3-6. TP-mediated phosphorylation of ERK1/2 was decreased by TPIP in CHO cells.** CHO cells stably expressing TP $\alpha$  (A, CHO-TP $\alpha$ ) or TP $\beta$  (B, CHO-TP $\beta$ ) in a 12-well plate were transfected with myc-TPIP (1.0  $\mu$ g/well) or empty vector (pcDNA3.1+, MOCK). Twenty-four h after transfection, cells were pretreated with FCS-free medium for 24 h, and then they were stimulated with U46619 (1  $\mu$ M) for the indicated times. Samples were separated by 11% and 8% SDS-PAGE for ERK1/2 and TPIP, respectively. Western blotting was performed using the anti-phospho ERK1/2 antibody, anti-ERK1/2 antibody and myc antibody. A typical blot is shown from CHO-TP $\alpha$  cells (A) or CHO-TP $\beta$  cells (B). The phosphorylation of ERK1/2 was summarized in CHO-TP $\alpha$  cells (C) of four experiments or CHO-TP $\beta$  cells (D) of three experiments. The levels of phosphorylation of ERK1/2 are shown as the fold increase above the basal level. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. \*P<0.05, two-way ANOVA.

過剰発現させた細胞では TP $\alpha$ 、TP $\beta$  を介した ERK1/2 のリン酸化は抑制する傾向が見られた (Fig. 3-6A,B)。

また CHO-TP $\alpha$  細胞、CHO-TP $\beta$  細胞では TP アゴニスト刺激により G $_q$  を介したホスファチジルイノシトール (PI) 水解反応の亢進が報告されている [62, 77]。そこで、TP アゴニスト誘発性 PI 水解反応の亢進に対する TPIP 過剰発現の影響を検討した。TP アゴニスト U46619 で刺激をすると、従来の報告通り CHO-TP $\alpha$  細胞、CHO-TP $\beta$  細胞共に濃度依存的な PI 水解反応の亢進が引き起こされた (Fig. 3-7A,B)。一方、TPIP を過剰発現させた細胞では TP $\alpha$ 、TP $\beta$  を介した PI 水解反応の亢進は有意に抑制された (Fig. 3-7A,B)。ムスカリン M $_3$  受容体は TP 同様 G $_q$  シグナルを介して PI 水解反応の亢進を引き起こすことが知られている [78, 79]。そこで、TPIP による PI 水解反応抑制作用の受容体選択性を検討するため、ムスカリン M $_3$  受容体介在 PI 水解反応に対する TPIP 過剰

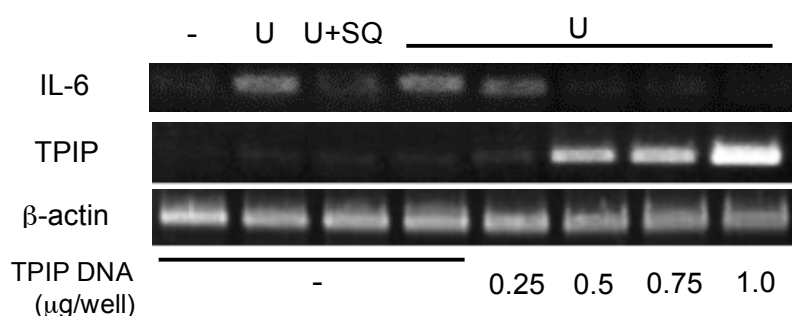


**Fig. 3-7. TP-mediated phosphoinositide hydrolysis was decreased by TPIP in CHO cells.** CHO cells stably expressing TP $\alpha$  (A, CHO-TP $\alpha$ ) or TP $\beta$  (B, CHO-TP $\beta$ ) were transfected with myc-TPIP (1.0  $\mu$ g/well) or empty vector (pcDNA3.1+, MOCK). Similarly, CHO cells stably expressing M $_3$  receptor (C, CHO-M $_3$ ) were transfected with myc-TPIP (1.0  $\mu$ g/well) or empty vector (pcDNA3.1+, MOCK). Twenty-four h after transfection, cells were labeled with 2  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H]inositol for 16 h, and were then stimulated with U46619 (10 nM-1  $\mu$ M) for 20 min. Total [<sup>3</sup>H]inositol phosphates were separated by an anion exchange column (AG1X-8, formate form) and their radioactivities were measured. The levels of inositol phosphates are shown as the fold increase above the basal level. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=3). \* P<0.05, \*\* P<0.001, two-way ANOVA.



発現の影響を検討した。ムスカリン  $M_3$  受容体を過剰発現させた CHO 細胞をムスカリン  $M_3$  受容体アゴニストであるカルバコールで刺激すると濃度依存的に PI 水解反応の亢進が確認された。しかし、この反応に対して TPIP 過剰発現による抑制作用は見られなかった。(Fig. 3-7C)。この結果から TPIP は全ての PI 水解反応を抑制するのではなく、TP を介する PI 水解反応を選択的に抑制することが示唆された。

Fig. 3-6 と Fig. 3-7 において TPIP は TP シグナルを抑制することが示唆されたが、これらの抑制作用は TP を過剰発現させた細胞を用いて検討したものであり、内因性の TP シグナルに対しても TPIP が抑制効果を示すかは定かではない。そこで、内因性 TP シグナルに対しても TPIP 過剰発現が影響を及ぼすか検討を行った。1321N1 ヒトアストロサイトーマ細胞には  $TP\alpha$ 、 $TP\beta$  が内因性に発現しており[80]、TP アゴニスト U46619 で刺激するとインターロイキン (IL)-6 mRNA 産生の亢進が引き起こされる[81]。そこで、1321N1 ヒトアストロサイトーマ細胞を用いて内因性 TP を介した IL-6 mRNA 産生亢進に対する TPIP 過剰発現の影響を検討した。すなわち、各濃度 TPIP プラスミドをトランスフェクションした 1321N1 ヒトアストロサイトーマ細胞を TP アゴニスト U46619 で



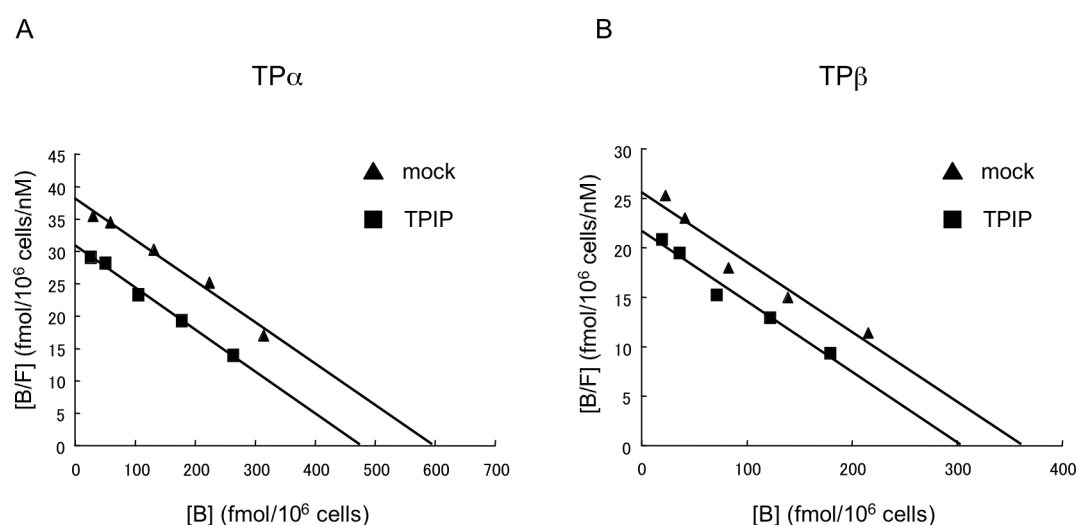
**Fig. 3-8. U46619-induced IL-6 mRNA expression was decreased by TPIP in 1321N1 cells.** 1321N1 cells were transfected with myc-TPIP (0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 μg/well) or empty vector (pcDNA3.1+). Twenty-four h after transfection, cells were incubated with 1 μM U46619 (U) or U46619 + 1 μM SQ29548 (SQ) for 4 h under FCS-free condition. RT-PCR was then performed.

刺激し IL-6 mRNA 産生量の検討を行った。TP アゴニスト U46619 刺激により IL-6 mRNA 産生の亢進がみられ、この反応は TP アンタゴニスト SQ29548 前処理により抑制されたことから TP を介した反応と考えられた (Fig. 3-8)。この内因性 TP を介した IL-6 mRNA 産生の亢進は TPIP の発現量依存的に抑制した (Fig. 3-8)。この結果から、TPIP は内因性の TP シグナルに対しても抑制作用を示すことが明らかになった。

### 3-3-5 細胞表面 TP 発現量に対する TPIP 過剰発現の影響

TPIP は TP を介する様々なシグナル伝達を抑制することが明らかになった (Fig. 3-6,7,8)、TPIP による TP シグナル抑制メカニズムは不明である。緒言でも述べたが GPCR 結合タンパク質には GPCR の局在変化を誘導するものが多く報告されている[29, 31, 32]。TPIP は二つの C2 ドメインを持ち (Fig. 3-2)、C2 ドメインの代表的な機能として  $\text{Ca}^{2+}$  依存的脂質結合能をもつことが知られてことから、TP と結合した TPIP が TP の細胞内局在変化を引き起こす可能性も考えられる。また、GPCR の細胞内領域に結合することで、GPCR のコンフォメーション変化を引き起こし、GPCR のリガンドに対するアフィニティーを低下させる可能性も考えられる[82]。そこで TPIP 過剰発現による TP 抑制メカニズムとして、細胞表面 TP 発現量の低下、および TP コンフォメーション変化によるリガンドアフィニティー低下の可能性について受容体結合実験による検討を行った。すなわち、TP $\alpha$  あるいは TP $\beta$  を安定発現させた HEK293 細胞に TPIP トランスフェクション後、 $^3\text{H}$  SQ29548 を用いた細胞表面受容体結合実験を行い、細胞表面における TP 数、リガンドアフィニティーを Scatchard 解析により算出した。その結果、TP $\alpha$ 、TP $\beta$  の解離定数  $K_d$  は TPIP 過剰発現により変化

しなかった (Fig. 3-9)。一方、 $[^3\text{H}]\text{SQ29548}$  結合部位  $B_{\text{max}}$  は TPIP 過剰発現により  $\text{TP}\alpha$ 、 $\text{TP}\beta$  共に減少することが明らかになった (Fig. 3-9)。データには示していないが TPIP 過剰発現が総 TP 量には影響しなかった。これらの結果から TPIP 過剰発現による TP シグナル伝達抑制メカニズムの一つとして、TPIP が細胞表面の TP 発現量を減少させることが示唆された。



**Fig. 3-9. Cell surface TP levels were decreased by TPIP in HEK293 cells stably expressing  $\text{TP}\alpha$  and  $\text{TP}\beta$ .** HEK293 cells stably expressing  $\text{TP}\alpha$  (A) and  $\text{TP}\beta$  (B) were transfected with myc-TPIP (15 mg/dish) (circle) or empty vector (pcDNA3.1+) (triangle). Twenty-four h after transfection, cell-surface TP levels were assessed by binding of  $[^3\text{H}]\text{SQ29548}$  to intact cells, and the data were expressed as Scatchard plots. Each point represents the mean of three determinations. The  $K_d$  values for SQ29548 were 15.6 nM for  $\text{TP}\alpha$ , 15.4 nM for  $\text{TP}\alpha$  with TPIP, 14.1 nM for  $\text{TP}\beta$  and 14.0 nM for  $\text{TP}\beta$  with TPIP, respectively. The  $B_{\text{max}}$  values were 597.2 fmol/ $10^6$  cells for  $\text{TP}\alpha$ , 475.8 fmol/ $10^6$  cells for  $\text{TP}\alpha$  with TPIP, 362.4 fmol/ $10^6$  cells for  $\text{TP}\beta$  and 304.5 fmol/ $10^6$  cells for  $\text{TP}\beta$  with TPIP, respectively.

### 3-4 考察

本章では、未知の TP を介するシグナル伝達制御メカニズムを明らかにするため、酵母ツーハイブリッド法を用いて新規 TP 結合タンパク質の探索を行った。その結果、TP $\alpha$  と TP $\beta$  の C 末端領域結合タンパク質として KIAA1005 を同定し、TP interacting protein (TPIP) と命名した。さらに TPIP を過剰発現させた CHO 細胞において TP を介するホスファチジルイノシトール水解反応の亢進や ERK1/2 のリン酸化反応が抑制され、TPIP を過剰発現させた 1321N1 細胞では TP を介する IL-6 mRNA 産生亢進作用が抑制された。すなわち、新規タンパク質である TP interacting protein (TPIP) が TP シグナル伝達を負に制御する因子であることを初めて明らかにした。

[ $^3\text{H}$ ]SQ29548 細胞表面受容体結合実験により TPIP 過剰発現が細胞表面の TP 発現レベルを減少させることが明らかになった (Fig. 3-7)。このことから TPIP による TP シグナル (ERK1/2 のリン酸化、ホスファチジルイノシトール水解反応、IL-6 mRNA 産生の亢進) の抑制作用 (Fig. 3-4, 5, 6) のメカニズムの一部には、TPIP は細胞表面の TP レベルを減少させる可能性が示唆された。TPIP は構造上の特徴として中央部に 2 つの C2 ドメイン、N 末端側に 5 つのコイルドコイルドメインをもつ (Fig. 3-2)。コイルドコイルドメインは  $\alpha$ -helix からなり、タンパク質自身の安定や他のタンパク質との結合に関与することが多くのタンパク質で報告されている。その一つにケラチンやラミンを初めとする中間径フィラメント構成タンパク質があり、コイルドコイルドメインを介して多量体化することで非常に安定なフィラメントを形成することが知られている [83, 84]。また微小管系モータータンパクの一つであるキネシン I はコイルドコイルドメインを介してホモ二量体を形成し、細胞内物質輸送を可能にしている [85]。一方 C2 ドメインは哺乳動物において cPLA<sub>2</sub> (cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>) [86]

や PKC $\alpha$  (protein kinase C- $\alpha$ ) [87, 88]、シナプトタグミン [89] をはじめとする 200 以上のタンパク質に保存される Ca<sup>2+</sup>結合モチーフである。C2 ドメインの典型的な機能として Ca<sup>2+</sup>の結合により活性化し膜へ移行することが知られている。cPLA<sub>2</sub> では C2 ドメインに 2 つの Ca<sup>2+</sup>が結合すると、核膜やゴルジ膜、小胞体膜に移行し結合することが報告されている [86, 90]。また PKC $\alpha$  は C2 ドメインに 2 つの Ca<sup>2+</sup>が結合すると細胞膜のホスファチジルセリンやホスファチジルイノシトール 4,5 二リン酸に結合することが報告されている [87, 88]。このように、C2 ドメインをもつタンパク質の多くは Ca<sup>2+</sup>の結合により細胞内の特異的な膜に結合しタンパク質機能が制御されている [91]。しかし、全ての C2 ドメインがこのような特徴を示すわけではなく、Ca<sup>2+</sup>結合部位の個数や Ca<sup>2+</sup>に対する親和性にばらつきがある。実際、Ca<sup>2+</sup>と結合しないものや [92]、他のタンパク質と結合できるものも報告されている [93, 94]。これらの知見から TPIP が自身の二つの C2 ドメインを介していくつかのタンパク質やリン脂質と相互作用し TP の細胞内局在やシグナル伝達を制御している可能性が考えられることから、今後の詳細な検討が必要である。

また本研究では TPIP の TP 特異性について検討した。ムスカリン M<sub>3</sub> 受容体をアゴニストであるカルバコールで刺激し惹起されるホスファチジルイノシトール水解反応の亢進は TPIP 過剰発現により減少しなかった (Fig.3-7C)。さらに TPIP は GPCR の一つである副甲状腺ホルモン受容体 (PTHrP) と結合しないことを  $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイにより明らかにしている (Tokue and Nakahata, unpublished observation)。これらの結果は TPIP が GPCR の中でも TP と選択的に相互作用する可能性を示している。また、以前 TP をノックアウトしたマウスでは外来抗原に対する免疫応答が増強することが報告されていることから、TP の免疫系における役割が示唆されている [60]。本研究で TPIP mRNA の組織発現を検討し、免疫応答に関与する胸腺において最も強い TPIP

mRNA の発現がみられたことは、胸腺において TPIP が TP と相互作用し免疫応答に関与している可能性も考えられ非常に興味深い。しかしながら、ヒト組織における TPIP mRNA 発現は必ずしも TP mRNA 発現と相関していないことから、TPIP が TP 以外のタンパク質と相互作用する可能性を除外することはできない。

TPIP による TP シグナル抑制メカニズムの一つとして細胞表面 TP 発現量の減少が示唆された。細胞表面受容体量は受容体の細胞内輸送に依存しており、細胞内輸送には small G タンパク質の Rab や Arf、膜融合に関与する soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (SNARE)、微小管系モータータンパク質など様々なタンパク質が協調して機能することが明らかになっている[95-98]。TPIP 過剰発現により引き起こされる TP の細胞内局在変化にも様々な輸送タンパク質の関与が考えられることから、TPIP に結合する TP 以外のタンパク質を探索することにより TPIP の TP 制御分子機構を明らかにすることができるものと思われる。一方、Fig. 3-6, 7, 8 で見られた TPIP による TP シグナルの抑制の程度は、Fig. 3-9 で見られた細胞表面 TP 量の減少の程度と比較して大きい。このことは、TPIP による TP シグナル抑制メカニズムが TP の細胞表面発現量の減少以外にも存在する可能性を示唆している。TPIP (1315 アミノ酸) は TP $\alpha$  (343 アミノ酸)、及び TP $\beta$  (407 アミノ酸) と比較して非常に巨大な分子であり、TPIP が TP の C 末端領域に結合することで TP と G タンパク質や TPIP 以外のタンパク質との結合を妨害する可能性も考えられる。また TPIP は TP $\alpha$ 、TP $\beta$  の C 末端領域共通配列である 313 から 328 番目のアミノ酸領域に結合する (Fig. 3-4) ことが明らかになったが、今回検討した TP の領域は C 末端部分だけであり、これ以外の細胞内領域と TPIP が相互作用する可能性も考えられる。これまで TP の細胞内領域に結合し受容体機能を制御するタンパク質がいくつか報告されている[72, 73]。TPIP に対する TP 結合部

位の詳細を明らかにすることは既存の TP 結合タンパク質との結合部位の競合や相互作用を推測する上で非常に重要である。

本章では、新規 TP 結合タンパク質として TPIP を同定し、このタンパク質が TP シグナルを抑制することを明らかにした。さらにその抑制メカニズムの一つとして細胞膜上の TP 量を減少させる作用を見出した。しかし、TPIP による TP シグナル抑制作用のメカニズム、生理的意義については未解明な部分が多く残されている。今後、TPIP の作用メカニズムや生理的意義が解明されることにより、新たな TP シグナル分子制御メカニズムが明らかになることが期待される。

## 4 章 総括

近年、GPCR を介するシグナル伝達の研究が進み必ずしもこれまで考えられてきた単純な経路ではなく、様々な因子によって複雑な制御を受けることが明らかになってきた。現在使用されている医療用医薬品の約半数が GPCR をターゲットとしていることから考えても、GPCR の制御機構を解明することは治療薬の新たな標的分子を見出すことだけではなく、既存医薬品の作用機序のさらなる理解や副作用の発症機構の理解及び軽減に繋がる。本研究ではこれら GPCR シグナル制御機構の一端を明らかにするため、RGS9-1 の GAP 活性調節機構及び TP の C 末端結合タンパク質による調節について検討を行った。

第 2 章では、細胞レベルにおける R9AP の RGS9-1GAP 活性促進機構が脂質ラフトを介することを見出した。今回、細胞レベルにおいても R9AP の GAP 活性促進作用が確認されたことや、R9AP による RGS9-1 の脂質ラフトへの局在化が  $G\alpha_{i/o}$  との会合し易くするという機構を示したことは、これまであいまいだった R9AP の GAP 活性促進機構を明らかにしたものであり、R7-RGS の活性制御を解明する上で重要な知見であると考えられる。また、R9AP に対する RGS9-1 の結合部位や、R7-RGS ファミリーのうち RGS9-1 に加え RGS9-2 と RGS11 との R9AP の結合性も明らかにした。さらに、これまでの報告とは異なり RGS9-1 と R9AP との結合には RGS9-1 分子中の DEP ドメイン以外に介在配列も必要であることが初めて明らかになった。このことは、新たな R7-RGS 制御分子の探索に重要な意味を持つと思われる。さらに、RGS9-2 と RGS11 が R9AP と結合することが明らかになったことは、*in vivo* においてそれら RGS が R9AP による制御を受けている可能性を示しており、中枢神経系における R7-RGS の新たな GAP 活性制御機構の解明に役立つものと思われる。

また第 3 章では酵母ツーハイブリッド法を用いて TP の細胞内 C 末端領域に



結合するタンパク質の探索を行い、TP interacting protein (TPIP)を同定した。さらに TPIP の TP シグナル伝達に対する影響を検討し、TP を介する様々なシグナルを抑制することを明らかにした。また TPIP による TP シグナル抑制メカニズムの一つとして細胞表面の TP 発現量を減少させることを明らかにした。以前、TP はアゴニスト依存的もしくは恒常的にインターナリゼーションすることが報告されており、これにより細胞表面の TP 量が減少し、その結果、シグナルの減弱が引き起こされることが知られている [99]。本研究で明らかになった TPIP による細胞膜 TP 量の減少は、TP の細胞膜へのトラフィックの阻害や、TP のインターナリゼーション後の細胞膜へのリサイクリング過程の抑制など TP の細胞内輸送機構を TPIP が制御している可能性が考えられる。一方、TPIP は PTHR やムスカリン M<sub>3</sub> 受容体と相互作用しなかったことから、TPIP は TP 特異的に作用している可能性が示唆された。しかし、TPIP mRNA と TP mRNA の発現パターンが必ずしも一致していないことから、TPIP は TP シグナル抑制作用以外の機能を持つ可能性も否定できず、今後さらなる検討が必要である。TXA<sub>2</sub> は気管支平滑筋の収縮や血小板の凝集作用を持つことから、現在臨床で気管支喘息や虚血性心疾患の治療薬として TXA<sub>2</sub> 合成酵素阻害薬や TP 拮抗薬が使用されている。今回、新たに TP のシグナルを制御する因子として TPIP を同定したことは、生理現象の調節機構を理解するための基礎研究としてだけでなく、応用研究の面からも薬物のターゲット分子として重要と考えられる。

本研究は、R9AP 及び TPIP による GPCR 活性の調節という今まで解明されていなかった GPCR 制御機構の一端を明らかにした。R9AP や TPIP に加え GPCR シグナルを制御するタンパク質の種類は今後さらに増えると思われる。それぞれの制御タンパク質の GPCR シグナルに及ぼす生理活性を詳細に解析することは、新しい GPCR 活性調節機構を明らかにすると共に、GPCR 機能調節の新たな標的分子を明らかにすることになると思われる。今後、GPCR 機能制

御タンパク質のさらなる研究の進展が期待される。

## 参考文献

- 1 Beukers, M. W. and Ijzerman, A. P. (2005) Techniques: how to boost GPCR mutagenesis studies using yeast. *Trends Pharmacol Sci.* **26**, 533-539
- 2 Foord, S. M., Bonner, T. I., Neubig, R. R., Rosser, E. M., Pin, J. P., Davenport, A. P., Spedding, M. and Harmar, A. J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev.* **57**, 279-288
- 3 Neves, S. R., Ram, P. T. and Iyengar, R. (2002) G protein pathways. *Science.* **296**, 1636-1639
- 4 Morris, A. J. and Malbon, C. C. (1999) Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev.* **79**, 1373-1430
- 5 Boyer, J. L., Waldo, G. L., Evans, T., Northup, J. K., Downes, C. P. and Harden, T. K. (1989) Modification of  $\text{AlF}_4^-$  and receptor-stimulated phospholipase C activity by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *J Biol Chem.* **264**, 13917-13922
- 6 Maruyama, Y., Nishida, M., Sugimoto, Y., Tanabe, S., Turner, J. H., Kozasa, T., Wada, T., Nagao, T. and Kurose, H. (2002)  $\text{G}\alpha_{12/13}$  mediates  $\alpha_1$ -adrenergic receptor-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res.* **91**, 961-969
- 7 Lei, Q., Jones, M. B., Talley, E. M., Garrison, J. C. and Bayliss, D. A. (2003) Molecular mechanisms mediating inhibition of G protein-coupled inwardly-rectifying  $\text{K}^+$  channels. *Mol Cells.* **15**, 1-9
- 8 Yakubovich, D., Rishal, I. and Dascal, N. (2005) Kinetic modeling of  $\text{Na}^+$ -induced,  $\text{G}\beta\gamma$ -dependent activation of G protein-gated  $\text{K}^+$  channels. *J Mol Neurosci.* **25**, 7-19
- 9 Rishal, I., Porozov, Y., Yakubovich, D., Varon, D. and Dascal, N. (2005)  $\text{G}\beta\gamma$ -dependent and  $\text{G}\beta\gamma$ -independent basal activity of G protein-activated  $\text{K}^+$  channels. *J Biol Chem.* **280**, 16685-16694
- 10 Sadjia, R., Alagem, N. and Reuveny, E. (2002) Graded contribution of the  $\text{G}\beta\gamma$  binding domains to GIRK channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 10783-10788

- 11 Jones, K. A., Borowsky, B., Tamm, J. A., Craig, D. A., Durkin, M. M., Dai, M., Yao, W. J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L. Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J. A., Morse, K., Laz, T., Smith, K. E., Nagarathnam, D., Noble, S. A., Branchek, T. A. and Gerald, C. (1998) GABA<sub>B</sub> receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA<sub>B</sub> R1 and GABA<sub>B</sub> R2. *Nature*. **396**, 674-679
- 12 Burchett, S. A. (2000) Regulators of G protein signaling: a bestiary of modular protein binding domains. *J Neurochem*. **75**, 1335-1351
- 13 Hollinger, S. and Hepler, J. R. (2002) Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev*. **54**, 527-559
- 14 Riddle, E. L., Schwartzman, R. A., Bond, M. and Insel, P. A. (2005) Multi-tasking RGS proteins in the heart: the next therapeutic target? *Circ Res*. **96**, 401-411
- 15 Hart, M. J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W. D., Gilman, A. G., Sternweis, P. C. and Bollag, G. (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by G  $\alpha_{13}$ . *Science*. **280**, 2112-2114
- 16 Fukuhara, S., Chikumi, H. and Gutkind, J. S. (2001) RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene*. **20**, 1661-1668
- 17 Labouesse, M. (2004) Epithelium-mesenchyme: a balancing act of RhoGAP and RhoGEF. *Curr Biol*. **14**, R508-510
- 18 Traver, S., Bidot, C., Spassky, N., Baltauss, T., De Tand, M. F., Thomas, J. L., Zalc, B., Janoueix-Lerosey, I. and Gunzburg, J. D. (2000) RGS14 is a novel Rap effector that preferentially regulates the GTPase activity of  $\alpha_0$ . *Biochem J*. **350 Pt 1**, 19-29
- 19 Mittal, V. and Linder, M. E. (2006) Biochemical characterization of RGS14: RGS14 activity towards G-protein  $\alpha$  subunits is independent of its binding to Rap2A. *Biochem J*. **394**, 309-315
- 20 Snow, B. E., Hall, R. A., Krumins, A. M., Brothers, G. M., Bouchard, D., Brothers, C. A., Chung, S., Mangion, J., Gilman, A. G., Lefkowitz, R. J. and Siderovski, D. P. (1998) GTPase activating specificity of

- RGS12 and binding specificity of an alternatively spliced PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domain. *J Biol Chem.* **273**, 17749-17755
- 21 Snow, B. E., Brothers, G. M. and Siderovski, D. P. (2002) Molecular cloning of regulators of G-protein signaling family members and characterization of binding specificity of RGS12 PDZ domain. *Methods Enzymol.* **344**, 740-761
- 22 Blumer, K. J. (2004) Vision: the need for speed. *Nature.* **427**, 20-21
- 23 Siderovski, D. P., Willard, F. S., Sanchez-Blazquez, P., Rodriguez-Diaz, M., Lopez-Fando, A., Rodriguez-Munoz, M., Garzon, J., Hooks, S. B., Waldo, G. L., Corbitt, J., Bodor, E. T., Krumins, A. M. and Harden, T. K. (2005) The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein  $\alpha$  subunits. *Int J Biol Sci* **1**, 51-66
- 24 Hooks, S. B., Waldo, G. L., Corbitt, J., Bodor, E. T., Krumins, A. M. and Harden, T. K. (2003) RGS6, RGS7, RGS9, and RGS11 stimulate GTPase activity of  $G_i$  family G-proteins with differential selectivity and maximal activity. *J Biol Chem.* **278**, 10087-10093
- 25 Sanchez-Blazquez, P., Rodriguez-Diaz, M., Lopez-Fando, A., Rodriguez-Munoz, M. and Garzon, J. (2003) The  $G\beta 5$  subunit that associates with the R7 subfamily of RGS proteins regulates  $\mu$ -opioid effects. *Neuropharmacology.* **45**, 82-95
- 26 Chen, C. K., Eversole-Cire, P., Zhang, H., Mancino, V., Chen, Y. J., He, W., Wensel, T. G. and Simon, M. I. (2003) Instability of GGL domain-containing RGS proteins in mice lacking the G protein  $\beta$ -subunit  $G\beta 5$ . *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 6604-6609
- 27 Witherow, D. S. and Slepak, V. Z. (2003) A novel kind of G protein heterodimer: the  $G\beta 5$ -RGS complex. *Receptors Channels.* **9**, 205-212
- 28 Martemyanov, K. A., Lishko, P. V., Calero, N., Keresztes, G., Sokolov, M., Strissel, K. J., Leskov, I. B., Hopp, J. A., Kolesnikov, A. V., Chen, C. K., Lem, J., Heller, S., Burns, M. E. and Arshavsky, V. Y. (2003) The DEP domain determines subcellular targeting of the GTPase activating protein RGS9 in vivo. *J Neurosci.* **23**, 10175-10181
- 29 Reiter, E. and Lefkowitz, R. J. (2006) GRKs and  $\beta$ -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol*

- Metab. **17**, 159-165
- 30 Kelly, E., Bailey, C. P. and Henderson, G. (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol.* **153 Suppl 1**, S379-388
- 31 Deretic, D., Williams, A. H., Ransom, N., Morel, V., Hargrave, P. A. and Arendt, A. (2005) Rhodopsin C terminus, the site of mutations causing retinal disease, regulates trafficking by binding to ADP-ribosylation factor 4 (ARF4). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 3301-3306
- 32 Tazawa, H., Takahashi, S. and Zilliacus, J. (2003) Interaction of the parathyroid hormone receptor with the 14-3-3 protein. *Biochim Biophys Acta.* **1620**, 32-38
- 33 Nishiguchi, K. M., Sandberg, M. A., Kooijman, A. C., Martemyanov, K. A., Pott, J. W., Hagstrom, S. A., Arshavsky, V. Y., Berson, E. L. and Dryja, T. P. (2004) Defects in RGS9 or its anchor protein R9AP in patients with slow photoreceptor deactivation. *Nature.* **427**, 75-78
- 34 Hu, G. and Wensel, T. G. (2002) R9AP, a membrane anchor for the photoreceptor GTPase accelerating protein, RGS9-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 9755-9760
- 35 Hu, G. and Wensel, T. G. (2004) Characterization of R9AP, a membrane anchor for the photoreceptor GTPase-accelerating protein, RGS9-1. *Methods Enzymol.* **390**, 178-196
- 36 Keresztes, G., Mutai, H., Hibino, H., Hudspeth, A. J. and Heller, S. (2003) Expression patterns of the RGS9-1 anchoring protein R9AP in the chicken and mouse suggest multiple roles in the nervous system. *Mol Cell Neurosci.* **24**, 687-695
- 37 Hu, G., Zhang, Z. and Wensel, T. G. (2003) Activation of RGS9-1GTPase acceleration by its membrane anchor, R9AP. *J Biol Chem.* **278**, 14550-14554
- 38 Morrison, T. G. and McQuain, C. O. (1978) Assembly of viral membranes: nature of the association of vesicular stomatitis virus proteins to membranes. *J Virol.* **26**, 115-125
- 39 Verkade, P. and Simons, K. (1997) Robert Feulgen Lecture 1997.

- Lipid microdomains and membrane trafficking in mammalian cells. *Histochem Cell Biol.* **108**, 211-220
- 40 Freeman, M. R., Cinar, B. and Lu, M. L. (2005) Membrane rafts as potential sites of nongenomic hormonal signaling in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab.* **16**, 273-279
- 41 Nebl, T., Pestonjamasp, K. N., Leszyk, J. D., Crowley, J. L., Oh, S. W. and Luna, E. J. (2002) Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes. *J Biol Chem.* **277**, 43399-43409
- 42 Garzon, J., Rodriguez-Munoz, M., de la Torre-Madrid, E. and Sanchez-Blazquez, P. (2005) Effector antagonism by the regulators of G protein signalling (RGS) proteins causes desensitization of  $\mu$ -opioid receptors in the CNS. *Psychopharmacology (Berl).* **180**, 1-11
- 43 Jones, M. B., Siderovski, D. P. and Hooks, S. B. (2004) The G $\beta\gamma$  dimer as a novel source of selectivity in G-protein signaling: GGL-ing at convention. *Mol Interv.* **4**, 200-214
- 44 Cabrera-Vera, T. M., Hernandez, S., Earls, L. R., Medkova, M., Sundgren-Andersson, A. K., Surmeier, D. J. and Hamm, H. E. (2004) RGS9-2 modulates D<sub>2</sub> dopamine receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> channel inhibition in rat striatal cholinergic interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 16339-16344
- 45 Lopez-Fando, A., Rodriguez-Munoz, M., Sanchez-Blazquez, P. and Garzon, J. (2005) Expression of neural RGS-R7 and G $\beta$ 5 Proteins in Response to Acute and Chronic Morphine. *Neuropsychopharmacology.* **30**, 99-110
- 46 Rahman, Z., Gold, S. J., Potenza, M. N., Cowan, C. W., Ni, Y. G., He, W., Wensel, T. G. and Nestler, E. J. (1999) Cloning and characterization of RGS9-2: a striatal-enriched alternatively spliced product of the RGS9 gene. *J Neurosci.* **19**, 2016-2026
- 47 Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D. and Gould, G. W. (2001) SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 5619-5624

- 48 Jansson, C. C., Pohjanoksa, K., Lang, J., Wurster, S., Savola, J. M.  
and Scheinin, M. (1999)  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonists stimulate  
high-affinity GTPase activity in a receptor subtype-selective manner.  
Eur J Pharmacol. **374**, 137-146
- 49 Sharom, F. J. and Radeva, G. (2004) GPI-anchored protein cleavage  
in the regulation of transmembrane signals. Subcell Biochem. **37**,  
285-315
- 50 Danielsen, E. M. and Hansen, G. H. (2003) Lipid rafts in epithelial  
brush borders: atypical membrane microdomains with specialized  
functions. Biochim Biophys Acta. **1617**, 1-9
- 51 Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal  
transduction. Nat Rev Mol Cell Biol. **1**, 31-39
- 52 Burchett, S. A. (2003) In through the out door: nuclear localization of  
the regulators of G protein signaling. J Neurochem. **87**, 551-559
- 53 Feron, O., Smith, T. W., Michel, T. and Kelly, R. A. (1997) Dynamic  
targeting of the agonist-stimulated M<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine  
receptor to caveolae in cardiac myocytes. J Biol Chem. **272**,  
17744-17748
- 54 Bi, K., Tanaka, Y., Coudronniere, N., Sugie, K., Hong, S., van  
Stipdonk, M. J. and Altman, A. (2001) Antigen-induced translocation  
of PKC- $\zeta$  to membrane rafts is required for T cell activation. Nat  
Immunol. **2**, 556-563
- 55 Ruppelt, A., Mosenden, R., Gronholm, M., Aandahl, E. M., Tobin, D.,  
Carlson, C. R., Abrahamsen, H., Herberg, F. W., Carpen, O. and  
Tasken, K. (2007) Inhibition of T cell activation by cyclic adenosine  
5'-monophosphate requires lipid raft targeting of protein kinase A  
type I by the A-kinase anchoring protein ezrin. J Immunol. **179**,  
5159-5168
- 56 Martemyanov, K. A., Yoo, P. J., Skiba, N. P. and Arshavsky, V. Y.  
(2005) R7BP, a novel neuronal protein interacting with RGS  
proteins of the R7 family. J Biol Chem. **280**, 5133-5136
- 57 Drenan, R. M., Doupnik, C. A., Boyle, M. P., Muglia, L. J., Huettner,  
J. E., Linder, M. E. and Blumer, K. J. (2005) Palmitoylation



- regulates plasma membrane-nuclear shuttling of R7BP, a novel membrane anchor for the RGS7 family. *J Cell Biol.* **169**, 623-633
- 58 Hepler, J. R. (2005) R7BP: a surprising new link between G proteins, RGS proteins, and nuclear signaling in the brain. *Sci STKE.* **2005**, pe38
- 59 Halushka, P. V. (2000) Thromboxane A<sub>2</sub> receptors: where have you gone? *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **60**, 175-189
- 60 Kabashima, K., Murata, T., Tanaka, H., Matsuoka, T., Sakata, D., Yoshida, N., Katagiri, K., Kinashi, T., Tanaka, T., Miyasaka, M., Nagai, H., Ushikubi, F. and Narumiya, S. (2003) Thromboxane A<sub>2</sub> modulates interaction of dendritic cells and T cells and regulates acquired immunity. *Nat Immunol.* **4**, 694-701
- 61 Shenker, A., Goldsmith, P., Unson, C. G. and Spiegel, A. M. (1991) The G protein coupled to the thromboxane A<sub>2</sub> receptor in human platelets is a member of the novel G<sub>q</sub> family. *J Biol Chem.* **266**, 9309-9313
- 62 Nakahata, N., Miyamoto, A., Ohkubo, S., Ishimoto, H., Sakai, K., Nakanishi, H., Ohshika, H. and Ohizumi, Y. (1995) G<sub>q/11</sub> communicates with thromboxane A<sub>2</sub> receptors in human astrocytoma cells, rabbit astrocytes and human platelets. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* **87**, 243-251
- 63 Nakahata, N. (2008) Thromboxane A<sub>2</sub>: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther.* **118**, 18-35
- 64 Offermanns, S., Laugwitz, K. L., Spicher, K. and Schultz, G. (1994) G proteins of the G<sub>12</sub> family are activated via thromboxane A<sub>2</sub> and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 504-508
- 65 Djellas, Y., Manganello, J. M., Antonakis, K. and Le Breton, G. C. (1999) Identification of G  $\alpha_{13}$  as one of the G-proteins that couple to human platelet thromboxane A<sub>2</sub> receptors. *J Biol Chem.* **274**, 14325-14330
- 66 Hirata, M., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Yokota, Y., Kageyama, R.,

- Nakanishi, S. and Narumiya, S. (1991) Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *Nature*. **349**, 617-620
- 67 Raychowdhury, M. K., Yukawa, M., Collins, L. J., McGrail, S. H., Kent, K. C. and Ware, J. A. (1994) Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *J Biol Chem*. **269**, 19256-19261
- 68 Turek, J. W., Halmos, T., Sullivan, N. L., Antonakis, K. and Le Breton, G. C. (2002) Mapping of a ligand-binding site for the human thromboxane A<sub>2</sub> receptor protein. *J Biol Chem*. **277**, 16791-16797
- 69 Yukawa, M., Yokota, R., Eberhardt, R. T., von Andrian, L. and Ware, J. A. (1997) Differential desensitization of thromboxane A<sub>2</sub> receptor subtypes. *Circ Res*. **80**, 551-556
- 70 Dev, K. K., Nakanishi, S. and Henley, J. M. (2001) Regulation of mglu<sub>7</sub> receptors by proteins that interact with the intracellular C-terminus. *Trends Pharmacol Sci*. **22**, 355-361
- 71 Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A. and Fagni, L. (2003) The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett*. **546**, 65-72
- 72 Hamelin, E., Theriault, C., Laroche, G. and Parent, J. L. (2005) The intracellular trafficking of the G protein-coupled receptor TPβ depends on a direct interaction with Rab11. *J Biol Chem*. **280**, 36195-36205
- 73 Sasaki, M., Sukegawa, J., Miyosawa, K., Yanagisawa, T., Ohkubo, S. and Nakahata, N. (2007) Low expression of cell-surface thromboxane A<sub>2</sub> receptor β-isoform through the negative regulation of its membrane traffic by proteasomes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **83**, 237-249
- 74 Nakahata, N., Matsuoka, I., Ono, T. and Nakanishi, H. (1989) Thromboxane A<sub>2</sub> activates phospholipase C in astrocytoma cells via pertussis toxin-insensitive G-protein. *Eur J Pharmacol*. **162**, 407-417
- 75 Miggin, S. M. and Kinsella, B. T. (2001) Thromboxane A<sub>2</sub> receptor mediated activation of the mitogen activated protein kinase cascades

- in human uterine smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*. **1539**, 147-162
- 76 Ashton, A. W. and Ware, J. A. (2004) Thromboxane A<sub>2</sub> receptor signaling inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell differentiation and migration. *Circ Res*. **95**, 372-379
- 77 Hirata, T., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Okuma, M. and Narumiya, S. (1996) Two thromboxane A<sub>2</sub> receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J Clin Invest*. **97**, 949-956
- 78 Morel, J. L., Macrez, N. and Mironneau, J. (1997) Specific G<sub>q</sub> protein involvement in muscarinic M<sub>3</sub> receptor-induced phosphatidylinositol hydrolysis and Ca<sup>2+</sup> release in mouse duodenal myocytes. *Br J Pharmacol*. **121**, 451-458
- 79 Sawaki, K., Hiramatsu, Y., Baum, B. J. and Ambudkar, I. S. (1993) Involvement of G  $\alpha_{q/11}$  in M<sub>3</sub>-muscarinic receptor stimulation of phosphatidylinositol 4,5 biphosphate-specific phospholipase C in rat parotid gland membranes. *Arch Biochem Biophys*. **305**, 546-550
- 80 Honma, S., Nakahata, N., Kobayashi, H., Ikeda, S., Takeda, N. and Ohizumi, Y. (1999) Decrease in thromboxane A<sub>2</sub> receptor expression by differentiation with dibutyryl cyclic AMP in 1321N1 human astrocytoma cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **58**, 51-62
- 81 Obara, Y., Kurose, H. and Nakahata, N. (2005) Thromboxane A<sub>2</sub> promotes interleukin-6 biosynthesis mediated by an activation of cyclic AMP-response element-binding protein in 1321N1 human astrocytoma cells. *Mol Pharmacol*. **68**, 670-679
- 82 Pohl, S. L., Krans, H. M., Kozyreff, V., Birnbaumer, L. and Rodbell, M. (1971) The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. VI. Evidence for a role of membrane lipids. *J Biol Chem*. **246**, 4447-4454
- 83 Franke, W. W. (1987) Nuclear lamins and cytoplasmic intermediate filament proteins: a growing multigene family. *Cell*. **48**, 3-4
- 84 Green, K. J. and Gaudry, C. A. (2000) Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol*. **1**,

208-216

- 85 Yildiz, A. and Selvin, P. R. (2005) Kinesin: walking, crawling or sliding along? *Trends Cell Biol.* **15**, 112-120
- 86 Evans, J. H., Gerber, S. H., Murray, D. and Leslie, C. C. (2004) The calcium binding loops of the cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> C2 domain specify targeting to Golgi and ER in live cells. *Mol Biol Cell.* **15**, 371-383
- 87 Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S., Ochoa, W. F., Fita, I. and Gomez-Fernandez, J. C. (1999) Ca<sup>2+</sup> bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase C $\alpha$  directly to phosphatidylserine. *Embo J.* **18**, 6329-6338
- 88 Stahelin, R. V., Rafter, J. D., Das, S. and Cho, W. (2003) The molecular basis of differential subcellular localization of C2 domains of protein kinase C- $\alpha$  and group IVa cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *J Biol Chem.* **278**, 12452-12460
- 89 Nalefski, E. A. and Falke, J. J. (1996) The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci.* **5**, 2375-2390
- 90 Glover, S., de Carvalho, M. S., Bayburt, T., Jonas, M., Chi, E., Leslie, C. C. and Gelb, M. H. (1995) Translocation of the 85-kDa phospholipase A<sub>2</sub> from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen. *J Biol Chem.* **270**, 15359-15367
- 91 Corbin, J. A., Evans, J. H., Landgraf, K. E. and Falke, J. J. (2007) Mechanism of specific membrane targeting by C2 domains: localized pools of target lipids enhance Ca<sup>2+</sup> affinity. *Biochemistry.* **46**, 4322-4336
- 92 Ortel, T. L., Quinn-Allen, M. A., Keller, F. G., Peterson, J. A., Larocca, D. and Kane, W. H. (1994) Localization of functionally important epitopes within the second C-type domain of coagulation factor V using recombinant chimeras. *J Biol Chem.* **269**, 15898-15905
- 93 Fukuda, M., Moreira, J. E., Liu, V., Sugimori, M., Mikoshiba, K. and

- Llinas, R. R. (2000) Role of the conserved WHXL motif in the C terminus of synaptotagmin in synaptic vesicle docking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 14715-14719
- 94 Llinas, R. R., Sugimori, M., Moran, K. A., Moreira, J. E. and Fukuda, M. (2004) Vesicular reuptake inhibition by a synaptotagmin I C2B domain antibody at the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 17855-17860
- 95 Pfeffer, S. R. (1999) Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat Cell Biol.* **1**, E17-22
- 96 Schimmoller, F., Simon, I. and Pfeffer, S. R. (1998) Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J Biol Chem.* **273**, 22161-22164
- 97 Chavrier, P. and Goud, B. (1999) The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol.* **11**, 466-475
- 98 Pelham, H. R. (1999) SNAREs and the secretory pathway-lessons from yeast. *Exp Cell Res.* **247**, 1-8
- 99 Sakai, K., Nakahata, N., Ono, H., Yamamoto, T. and Ohizumi, Y. (1996) Homologous desensitization of thromboxane A<sub>2</sub> receptor in 1321N1 human astrocytoma cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **276**, 829-836

## 謝辞

本研究は東北大学薬学研究科細胞情報薬学分野で行われました。

本研究を遂行するにあたり、御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野 中畑則道教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

本論文を審査して戴き、適切な御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野 榎本武美教授、生活習慣病治療薬学分野 平澤典保教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、終始、御協力と御激励を賜りました東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野 守屋孝弘准教授、国立医薬品食品衛生研究所薬理 大久保聡子博士（旧 東北大学大学院薬学研究科 細胞情報薬学分野助教）ノースカロライナ大学医学部薬理教室 T. Kendall Harden 教授、東北大学大学院薬学研究科 細胞情報薬学分野 佐々木雅子博士、小原祐太郎助教、斎藤将樹助教に深く御礼申し上げます。

最後に、公私にわたり多大なるご協力と御激励をいただきました東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野の諸氏に深く感謝致します。

本学位論文は以下の論文を基礎としたものである。

- 1) Thromboxane A<sub>2</sub>-induced signal transduction is negatively regulated by KIAA1005 that directly interacts with thromboxane A<sub>2</sub> receptor

Shin-ichi Tokue, Masako Sasaki, Norimichi Nakahata

Prostaglandins Other Lipid Mediat. In press

- 2) Raft-dependent activation of RGS9-1 by RGS9-1 anchoring protein (R9AP)

Shin-ichi Tokue, Satoko Ohkubo, T. Kendall Harden, Norimichi Nakahata

(Manuscript in preparation)